

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAYANA CRISTINA DA SILVA SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE NOVO REPELENTE E LARVICIDA PARA *Aedes*
aegypti

CURITIBA

2020

NAYANA CRISTINA DA SILVA SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE NOVO REPELENTE E LARVICIDA PARA *Aedes*
aegypti

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química do Setor de Ciências Exatas da
Universidade Federal do Paraná como requisito
para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques.

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S237d Santos, Nayana Cristina da Silva
Desenvolvimento de novo repelente e larvicida para *Aedes aegypti* [recurso eletrônico] / Nayana Cristina da Silva Santos. – Curitiba, 2020.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

Orientador: Francisco de Assis Marques.

1. *Aedes aegypti*. 2. Dengue. 3. Arboviroses. 4. Inseticidas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marques, Francisco de Assis. III. Título.

CDD : 363.7

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **NAYANA CRISTINA DA SILVA SANTOS** intitulada: **Desenvolvimento de novo repelente e larvicida para *Aedes Aegypti***, sob orientação do Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS MARQUES, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

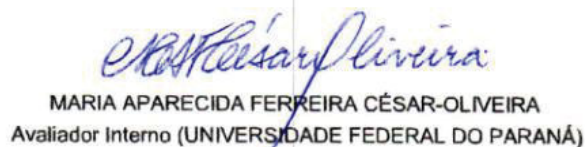
CURITIBA, 19 de Fevereiro de 2020.



FRANCISCO DE ASSIS MARQUES
Presidente da Banca Examinadora



ITAMAR FRANCISCO ANDREAZZA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



MARIA APARECIDA FERREIRA CÉSAR-OLIVEIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



GISELLE MARIA MACIEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)



ROSE MARIA CARLOS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela vida, por todo amor e proteção em toda minha jornada.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial expresso minha gratidão as seguintes pessoas:

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Marques pela orientação, oportunidade, confiança e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Itamar Andreazza por todo acolhimento em seu laboratório e incentivo.

Aos meus pais, Manoel Silva e Laurenir da Silva os quais desde pequena me ensinaram a ter responsabilidade, a estudar e acima de tudo a não ter medo de enfrentar os desafios.

Ao meu esposo Felipe Danilo, que se faz luz e alegria em quase todos os dias. Por todo carinho, amor e apoio que me deu, desde o começo, sempre me fazendo continuar, apesar das diversidades das situações. Você me ajuda a enxergar a leveza da vida; me mostrando diariamente o que realmente importa em nossa caminhada.

As duas pessoas especiais que me acolheram nesta cidade:

Antônia, pessoa que me acolheu em sua casa, assim que cheguei na cidade, com todo carinho de uma mãe.

E a Dione, uma grande amiga que sempre estava disposta a me dá conselhos e a jogar “conversa fora” para desestressar do dia-a-dia.

Aos meus colegas do Lecosin: Meira, Tamires, Renata, Renan e Joslaine, por toda ajuda neste trabalho e todas conversas e incentivos para continuar nesta jornada.

Aos professores da banca Itamar Francisco Andreazza, Giselle Maria Maciel, Maria Aparecida Ferreira César-Oliveira e Rose Maria Carlos por todas contribuições na tese.

À equipe do grupo de pesquisa do professor Dr. Mario Antonio Navarro da Silva, coordenador do Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae da UFPR, pela concessão do uso de seu laboratório e dos mosquitos adultos e larvas de *Aedes aegypti*, necessários para os testes de repelência e de atividade larvicida.

À equipe do grupo coordenado pelo Dr. João Antonio Cyrino Zequi, do Laboratório de Entomologia Médica da Universidade Estadual de Londrina, pela

produção das proteínas de Bti e pelos bioensaios para avaliar a atividade larvícida do formulado preparado.

Agradeço o apoio financeiro decorrente do projeto intitulado “Inovação em produtos de controle e repelência do vetor e no monitoramento de arbovírus”, Chamada MCTI-CNPq/ MEC-CAPES/ MS-Decit Nº 14/2016 - Prevenção e Combate ao vírus Zika.

Aos Professores e funcionários da Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná.

A Universidade Federal do Paraná.

À CAPES e ao CNPQ, pelo auxílio financeiro nesta pesquisa.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou ainda o que quero ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”. (Martin Luther King)

RESUMO

O mosquito *Aedes aegypti* é o principal vetor responsável pela transmissão do vírus da dengue, zika, chikungunya e da febre amarela urbana. Por este motivo o desenvolvimento de estratégias inovadoras, inteligentes e de fácil aplicação são necessárias para o combate ao *A. aegypti*, tendo em vista que até o momento não existe vacina que seja totalmente eficaz e de baixo custo. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de novos compostos com ação repelente e de nova formulação de larvicida para combater o *A. aegypti* e minimizar os impactos causados por esse vetor. Desta maneira foi confeccionado um comprimido larvicida (50 mg) utilizando o liofilizado de Bti que mostrou atividade até 45 dias em campo em até 50 L de água potável. Também foi preparado um pó larvicida que apresentou toxicidade às larvas de *Aedes* e *Culex* por mais de 7 semanas em campo, utilizando 1 g do pó larvicida em 500 L de água potável, sendo comprovado também por Fitotron, Uv-vis e teste de bioensaio a estabilidade das proteínas de Bti e a não fotolabilidade das mesmas. Os resultados desse estudo nos levaram ao desenvolvimento de uma formulação de larvicida inédita a nível mundial, a base de proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis israelensis* – Bti, e que podem ser empregadas para o controle de larvas de mosquitos de forma tradicional, bem como em grandes volumes de água. Ressalta-se que essa formulação de larvicida, além de ser seletiva para o combate de larvas de mosquitos, não apresentou toxicidade para os diversos organismos estudados nos ensaios de ecotoxicidade. No que tange ao efeito de repelência, foi sintetizada uma substância, a partir do anidrido ftálico, que apresentou ação repelente de 7 h, sendo que os estudos de estrutura atividade desenvolvidos nesse trabalho serviram como base para o desenvolvimento, em nosso laboratório, de outra substância inédita com ação repelente ainda mais prolongada e que pode se constituir no primeiro repelente de alta eficiência desenvolvido na América Latina. Assim sendo, como resultado desse trabalho, desenvolveu-se um repelente que pode ser sintetizado em grande escala, a partir de produto de baixo custo, assim como um larvicida eficaz e de formulação inédita e de baixa toxicidade, podendo subsidiar o poder público no atendimento das demandas nacionais no que se refere a um dos principais problemas de saúde pública.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Larvicida. Repelente.

ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector responsible for the transmission of dengue, zika, chikungunya and urban yellow fever virus. For this reason, the development of innovative, intelligent and easy-to-apply strategies are necessary to combat *A. aegypti*, considering that so far there is no vaccine that is fully effective and low cost. Given the above, this work aimed to develop new compounds with repellent action and a new formulation of larvicide to combat *A. aegypti* and minimize the impacts caused by this vector. In this way, a larvicidal tablet (50 mg) was made using lyophilized Bti that showed activity for up to 45 days in the field in up to 50 L of drinking water. A larvicidal powder was also prepared, which showed toxicity to *Aedes* and *Culex* larvae for more than 7 weeks in the field, using 1 g of the larvicidal powder in 500 L of drinking water, also being proven by Fitotron, UV-vis and a bioassay test the stability of Bti proteins and its non-photolability. The results of this study led us to the development of an unprecedented larvicide formulation worldwide, based on proteins produced by *Bacillus thuringiensis israelensis* - Bti, which can be used to control mosquito larvae in a traditional way, as well as in large volumes of water. It is noteworthy that this formulation of larvicide, in addition to being selective for combating mosquito larvae, did not present toxicity for the various organisms studied in ecotoxicity tests. Regarding the repellency effect, a substance was synthesized from phthalic anhydride, which had a repellent action for 7 hours. The activity/structure study developed in this work served as a basis for the development, in our laboratory, of another unprecedented substance with an even better repellent action and which may constitute the first high-efficiency repellent developed in Latin America. Therefore, as a result of this work, a repellent has been developed that can be synthesized, on large scale, from a low-cost starting material, as well as an effective larvicide with unprecedented formulation and low toxicity, which can subsidize the public power in programs aiming at the control of *A. aegypti* mosquito.

Keywords: *Aedes aegypti*. Larvicide. Repellent.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	23
FIGURA 2- CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE AMARELA NO BRASIL.....	28
FIGURA 3 – ESTRUTURAS REPRESENTANDO AS PRINCIPAIS CLASSES DE INSETICIDAS QUÍMICOS	31
FIGURA 4 – ESTRUTURA DO TEMEFÓS.....	33
FIGURA 5 - ESTRUTURAS ESQUEMÁTICA DAS PROTEÍNAS Cry E Cty.....	34
FIGURA 6 - <i>N</i> - [(4-CLOROFENIL) CARBAMOIL] -2,6-DIFLUOROBENZAMIDA (DIFLUBENZURON).....	34
FIGURA 7 - ATUAÇÃO DO BIOLARVICIDA <i>Bti</i> NO INTESTINO LARVAL.....	36
FIGURA 8 - REPELENTES DE MOSQUITOS UTILIZADOS A NÍVEL MUNDIAL.....	37
FIGURA 9 - ESTRUTURAS QUÍMICAS CANDIDATAS A REPELENTE	39
FIGURA 10 - ESTRUTURAS DE POSSÍVEIS REPELENTES DERIVADOS DO ANIDRIDO FTÁLICO	39
FIGURA 11 - <i>Daphnia magna</i>	41
FIGURA 12 - <i>Desmodesmus subspicatus</i>	43
FIGURA 13 - <i>Artemia salina</i>	44
FIGURA 14 - A) MÁQUINA DE COMPRESSÃO DE COMPRIMIDO – ERWEKA EK0; (B) ETAPAS DO PROCESSO DE COMPRESSÃO EM MÁQUINA DE COMPRIMIR: (1) ALIMENTAÇÃO; (2) COMPACTAÇÃO; (3) COMPRESSÃO; (4) EJEÇÃO; (5) EXPULSÃO; (6) PRÉ-ALIMENTAÇÃO; COMPRIMIDOS LARVICIDAS; D) COMPRESSÃO DIRETA E INDIRETA	51
FIGURA 15 - PÓ LARVICIDA EM ÁGUA.....	52
FIGURA 16 - TESTE EM CAMPO COM COMPRIMIDOS LARVICIDAS	53
FIGURA 17 - BIOENSAIO DE PRÉ-CAMPO UTILIZANDO PÓ LARVICIDA PARA CONTROLE DE <i>Culex</i>	57
FIGURA 18 - POSICIONAMENTO DA MÃO NA GAIOLA DURANTE A REALIZAÇÃO DOS TESTES DE REPELÊNCIA.....	67
FIGURA 19 - ESTRUTURA QUÍMICA DA HIDROXIPROPILMETILCELULOSE (HPMC)	68
FIGURA 20 - DEMOSTRAÇÃO DE COMO OCORRE A LIBERAÇÃO LENTA DAS PROTEÍNAS COM O USO DO HPMC.....	69
FIGURA 21 – ESTRUTURA DO POLIETILENOGLICOL (PEG).....	70
FIGURA 22 - MORTALIDADE DE LARVAS DE <i>A. aegypti</i> EXPOSTAS A DIFERENTES FORMULADOS DE <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> – <i>Bti</i> EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO.....	71
FIGURA 23 - CÂMARA DE FITOTRON UTILIZADA NO EXPERIMENTO	74
FIGURA 24 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO LIOFILIZADO RECEBIDO DA UEL - CRISTAIS DE BTI (A) E (B) MATERIAL LIOFILIZADO DE BTI (C) ENDOSPOROS (D) CRISTAIS	75
FIGURA 25 - DIFERENTES TIPOS DE FORMULAÇÕES DO PÓ LARVICIDA: (A) PL1 COM AS CARACTERÍSTICAS DESEJADAS E (B) PÓ LARVICIDA COM GRÂNULOS MAIS AGREGADOS UM AO OUTRO.	77

FIGURA 26 - (A) E (C) LARVAS MORTAS POR FALTA DE ALIMENTO (B) E (D) LARVAS MORTAS COM TRATAMENTO LARVICIDA.....	78
FIGURA 27 - ENSAIO EM CAMPO COM LARVAS DE <i>Culex quinquefasciatus</i>	80
FIGURA 28- SÍNTESE DE DERIVADOS DO ANIDRIDO FTÁLICO	87
FIGURA 29 - MECANISMO PARA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS CANDIDATOS A REPELENTES	89
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3A).....	90
FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3A).....	91
FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3B).....	92
FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3B).....	93
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO 2(PIRROLIDIL-1- CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3c)	94
FIGURA 35 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3c)	95
FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3D).....	96
FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO COMPOSTO 2(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3D).....	97
FIGURA 38 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3E).....	98
FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3E).....	99
FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3F).....	100
FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C DO COMOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3F).....	101
FIGURA 42 - ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE METILA (4A)	102
FIGURA 43 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE METILA (4A).....	103
FIGURA 44 - ESPECTRO DE RMN ¹ H DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO D ETILA (4B).....	104
FIGURA 45 - ESPECTRO DE RMN ¹³ C DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE ETILA (4B).....	105
FIGURA 46 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3A).....	105

FIGURA 47 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS PARA OS FRAGMENTOS MAJORITÁRIOS, ÍON M/Z 163 E M/Z 70	106
FIGURA 48 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3B).....	106
FIGURA 49 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS PARA O FRAGMENTO, ÍON M/Z 149	107
FIGURA 50 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CABONIL)- BENZOATO DE (3c).....	107
FIGURA 51 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3D).....	108
FIGURA 52 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS PARA OS FRAGMENTOS MAJORITÁRIOS, ÍON M/Z 163 E M/Z 84.....	108
FIGURA 53 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3E).....	109
FIGURA 54 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3F).....	109
FIGURA 55 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)- BENZOATO DE METILA (4A)	110
FIGURA 56 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE ETILA (4B).....	110
FIGURA 57 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS PARA OS FRAGMENTOS MAJORITÁRIOS, ÍON M/Z 177 E ÍON M/Z 149	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SOLUÇÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	49
TABELA 2 - SOLUÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS	49
TABELA 3 - FORMULAÇÃO DOS COMPRIMIDOS PARA O TESTE DE BIOENSAIO EM CAMPO	51
TABELA 4 - CONDIÇÕES REFERENTES AO CLIMA DO NORDESTE BRASILEIRO COLOCADOS NO FITOTRON	55
TABELA 5 - PARÂMETROS DO BIOENSAIO TOXICOLÓGICO	60
TABELA 6 - RENDIMENTOS DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS PELO MÉTODO A	63
TABELA 7 - RENDIMENTOS DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS PELO MÉTODO B	64
TABELA 8 - FATORES ABIÓTICOS DURANTE O BIOENSAIO EM CAMPO DOS QUATRO FORMULADOS DE BTI SOBRE <i>Aedes aegypti</i>	72
TABELA 9 - CONCENTRAÇÃO LETAL DO FORMULADO IV SOBRE <i>Aedes aegypti</i> E VALORES DE UTI/mg COMPARADOS COM WDG: (LOTE: 259-387-PG, VALIDADE 11/2017)	73
TABELA 10 - RESULTADO EM PORCENTAGEM DAS MORTALIDADES DAS LARVAS DE <i>Culex</i> MONITORADAS SEMANALMENTE	80
TABELA 11 - BRANCO DO TESTE ECOTOXICOLÓGICO PARA AS SUSPENSÕES FILTRADAS	81
TABELA 12 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 1ª SUSPENSÃO (LIOF. Bti – FILTRADO)	81
TABELA 13 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 2ª SUSPENSÃO (PL1 – FILTRADO)	81
TABELA 14 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 3ª SUSPENSÃO (EXCIPIENTE – FILTRADO)	81
TABELA 15 - BRANCO DO TESTE ECOTOXICOLÓGICO PARA AS SUSPENSÕES SEM FILTRAÇÃO	82
TABELA 16 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 4ª SUSPENSÃO (LIOF. Bti (2 mg) – SEM FILTRAÇÃO)	82
TABELA 17 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 4ª SUSPENSÃO (LIOF. Bti (10 mg) – SEM FILTRAÇÃO)	83
TABELA 18 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 5ª SUSPENSÃO (PL1 (2 mg) – SEM FILTRAÇÃO)	83
TABELA 19 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 5ª SUSPENSÃO (PL1 (10 mg) – SEM FILTRAÇÃO)	83
TABELA 20 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 5ª SUSPENSÃO (EXCIPIENTE (2 mg) – SEM FILTRAÇÃO)	83
TABELA 21 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 5ª SUSPENSÃO (EXCIPIENTE (10 mg) – SEM FILTRAÇÃO)	84
TABELA 22 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA AMOSTRA - FILTRADO	84
TABELA 23 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA AMOSTRA – SEM FILTRAÇÃO	85
TABELA 24 - ENSAIO TOXICOLÓGICO UTILIZANDO <i>Artemia Salina</i>	86
TABELA 25 - TESTE DE REPELÊNCIA DE DERIVADOS DO ANIDRIDO FTÁLICO	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. aegypti – *Aedes aegypti*

ABNT - Associação Brasileira das Normas Técnicas

AChE - Enzima acetilcolinesterase

Bt - *Bacillus thuringiensis*

Bti - *Bacillus thuringiensis israelenses*

BOD - Biochemical Oxygen Demand.

CCD - Cromatografia em Camada delgada

CDC - Center of Disease Control

CL₅₀ - Concentração letal média

CL₉₀ - Concentração letal para matar 90% da população

CPD - Critical Point Dryer

DEET - *N,N*-dietil-meta-toluamida

DENV- (1-4) - Vírus Dengue sorotipo 1, 2, 3 ou 4.

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

IR3535 - 3-(*N*-butilacetamido) propanoato de etila

HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose

Liof. - Liofilizado

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

m/v – Massa / volume

m/z - Relação massa / carga

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PEG – Poli (etileno glicol)

pH - Potencial Hidrogeniônico

PL - Pó larvícida

PMD - *p*-mentano 3,8-diol

PVC – Poli (cloreto de vinila)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

® - Marca registrada

TMS - Tetrametilsilano

UBV - Ultrabaixo volume

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UTIs/mg - Unidades Tóxicas Internacionais por miligramas

UV-Vis - Ultravioleta visível

WHO - World Health Organization

δ - Deslocamento químico

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1.	Espécie <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) e seu ciclo de vida	22
2.2.	Dengue: aspectos gerais	25
2.3.	Chikungunya, Zika e Febre amarela – Aspectos Gerais	26
2.4.	Inseticidas	30
2.4.1.	Larvicidas	33
2.5.	Atividade repelente.....	37
2.6.	Ecotoxicidade e teste de toxicidade.....	39
2.7.	Organismos testes	41
2.7.1.	<i>Daphnia magna</i>	41
2.7.2.	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	42
2.7.3.	<i>Artemia salina</i>	44
3.	OBJETIVOS.....	46
3.1.	Objetivo Geral	46
3.2.	Objetivos Específicos	46
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1.	Bioensaios	48
4.1.1.	Criação das Larvas	48
4.2.	Quantificação de proteínas totais solúveis do fermentado liofilizado de Bti pelo método Biureto e Bradford	48
4.2.1.	Quantificação de proteínas totais solúveis pelo método Biureto	48
4.2.2.	Quantificação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford	49
4.3.	Teste de fotolabilidade das proteínas de Bti frente à Luz UVA e UVB.....	50
4.4.	Teste de viabilidade dos endosporos de Bti frente a Luz UVA e UVB.....	50
4.5.	Obtenção e formulação dos comprimidos larvicidas	50

4.6. Preparação do larvicida com fermentado liofilizado de Bti em forma de pó (PL)..	52
4.7. Análises dos comprimidos larvicidas em campo.....	53
4.8. Análises de comprimidos larvicidas por Fitotron (câmara de fotoperíodo) - (laboratorial).....	54
4.9. Determinação da atividade larvicida para o experimento do Fitotron	55
4.10. Determinação da atividade larvicida do pó (PL)	56
4.11. Determinação da atividade larvicida utilizando o pó larvicida (PL1) para controle do <i>Culex</i>	57
4.12. Testes ecotoxicológicos	58
4.12.1. Teste com <i>Daphnia magna</i>	58
4.12.2. Teste com <i>Scenedesmus subspicatus</i>	58
4.12.3. Preparação das suspensões utilizadas nos testes ecotoxicológico com <i>Daphnia magna</i> e <i>Scenedesmus subspicatus</i>	59
4.12.4. Teste com <i>Artemia salina</i>	59
4.13. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV	60
4.13.1. Ponto Crítico - MEV	61
4.14. Síntese de novos repelentes derivados do anidrido ftálico	61
4.15. Teste de repelência	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1. Confeção e análises de comprimidos larvicidas em campo.....	68
5.2. Teste de fotolabilidade das proteínas de Bti frente à Luz UVA e UVB.....	70
5.3. Teste de viabilidade dos endosporos de Bti frente à Luz UVA e UVB.....	70
5.4. Bioensaios para determinação da atividade larvicida dos comprimidos em campo	71
5.5. Análises dos comprimidos larvicidas verificando a estabilidade das proteínas do Bti utilizando Fitotron	73
5.6. Bioensaios para determinação da atividade larvicida utilizando os comprimidos expostos ao Fitotron	74

5.7. Caracterização morfológica do fermentado liofilizado de Bti por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	75
5.8. Desenvolvimento de nova formulação larvicida e bioensaios para determinação da atividade larvicida.....	76
5.9. Determinação da atividade larvicida utilizando o pó larvicida (PL1) para controle do <i>Culex quinquefasciatus</i> (pernilongo).....	79
5.10. Testes ecotoxicológico.....	80
5.10.1. Teste com <i>Daphnia magna</i>	80
5.10.2. Teste com alga <i>Desmodesmus subspicatus</i>	84
5.10.3. Teste com <i>Artemia salina</i>	86
5.11. Síntese de novos repelentes derivados do anidrido ftálico	87
5.12. Teste de repelência dos derivados do anidrido ftálico	111
6. CONCLUSÃO.....	114
REFERÊNCIA.....	116

1. INTRODUÇÃO

Hoje a dengue é a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui-se em sério problema de saúde pública no Brasil onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do vetor. A dengue está relacionada com os chamados macrofatores (ambientais, socioeconômicos, políticos e sociais) e os microfatores (dependentes das características biológicas do vírus, do vetor e da pessoa afetada) (OPAS, 2019). A dengue nas Américas atingiu o maior número de casos já registrados na História, com mais de 2,7 milhões de casos, incluindo 22.127 graves e 1.206 mortes notificadas até o final de outubro de 2019. O Brasil, dada sua grande população, teve o maior número nesta atualização, com 2.070.170 casos notificados conforme uma nova atualização epidemiológica da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2019).

As informações apresentadas são referentes ao período das Semanas Epidemiológicas (SE) 1 a 34 (30/12/2018 a 24/08/2019), comparando-se com o mesmo período para o ano de 2018 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em 2019, até a SE 34, foram registrados 1.439.471 casos prováveis de dengue no país. No mesmo período de 2018, foram registrados 205.791 casos prováveis. Observa-se um incremento de 599,5% no número de casos prováveis em 2019, em comparação ao mesmo período do ano anterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A análise do coeficiente de incidência de dengue (número de casos/100 mil hab.) em 2019, até a SE 34, segundo regiões geográficas, evidencia que as regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentam as maiores incidências: 1.196,1 casos/100 mil hab. e 1.139,2 casos/100 mil hab., respectivamente. Detalhando: Minas Gerais (2.239,3 casos/100 mil hab.), Goiás (1.561,6 casos/100 mil hab.), Espírito Santo (1.493,3 casos/100 mil hab.), Mato Grosso do Sul (1.466,1 casos/100 mil hab.) e Distrito Federal (1.194,4 casos/100 mil hab.). Até o momento (SE 34 de 2019), foram confirmados 591 óbitos e 486 (82,2%) estão em investigação. Os estados com maior número de óbitos por dengue são: Minas Gerais (121), São Paulo (95), Goiás (100), Rio Grande do Norte (56), Pernambuco (39), Bahia (22) e Ceará (16) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Segundo a Secretaria de Estado da Saúde (SESA/PR) quantidade de casos da doença no Paraná cresceu 62,25% em três semanas. Em 17 de dezembro de 2019, eram 3.293 confirmações; número que saltou para 5.343 no dia 7 de janeiro de 2020. O aumento foi de mais de 2 mil casos. Quando a comparação é realizada entre períodos

epidemiológicos - de agosto de um ano a julho do ano seguinte -, os números assustam ainda mais. Enquanto entre agosto de 2019 e a primeira semana de janeiro de 2020 foram registrados os atuais 5.343 casos, o período de estudo anterior, de agosto de 2018 até a primeira semana de janeiro de 2019, apontou apenas 129 casos. Um avanço de 4.041% nas ocorrências da doença (SESA/PR, 2020).

Já em relação a chikungunya no Brasil, em 2019, até a SE 34, foram registrados 110.627 casos prováveis desta doença no país. No mesmo período de 2018, foram registrados 76.742 casos prováveis. Em 2019, até a SE 34, foram confirmados 57 óbitos (47 no Rio de Janeiro, 5 na Bahia, 1 no Maranhão, 1 na Paraíba, 1 em Minas Gerais, 1 no Distrito Federal e 1 no Espírito Santo) por chikungunya, sendo 29 do sexo masculino e 28 do sexo feminino. Destaca-se que existem 65 óbitos em investigação, sendo 28 (43,1 %) no estado do Rio Grande do Norte e 22 (33,8%) em Pernambuco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em relação a Zika, em 2019, até a SE 33, foram registrados 9.813 casos prováveis no país. No mesmo período de 2018, foram registrados 6.669 casos prováveis. A análise da taxa de incidência de casos prováveis de Zika (número de casos/100 mil hab.) em 2019, até a SE 33, segundo regiões geográficas, evidencia que as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte apresentam os maiores valores: 6,7 casos/100 mil hab., 6,2 casos/100 mil hab. e 4,9 casos/100 mil hab., respectivamente. Destacam-se Tocantins (32,3 casos/100 mil hab.), Rio Grande do Norte (27,0 casos/100 mil hab.), Alagoas (18,0 casos/100 mil hab.) e Espírito Santo (15,7 casos/100 mil hab.). Em 2019, foram registrados 1.649 casos prováveis de Zika em gestantes, sendo 447 casos confirmados. Ressalta-se que 42,95% (192) dos casos confirmados foram registrados no Rio de Janeiro, seguido de Espírito Santo (14,77%;66), Minas Gerais (10,51%;47), Alagoas (7,16%;32), Paraíba (3,58%;16) e Mato Grosso do Sul (com 3,13%;14). Todos os dados referentes a esse agravo são provenientes do Sinan Net. Em 2019, até a SE 33, foram confirmados dois óbitos por Zika no estado da Paraíba (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Diante dos dados expostos, uma forma para diminuir tais taxas de doenças e mortes é a eliminação de mosquitos e vetores dessas epidemias, logo é realizada na grande maioria das vezes, a utilização de inseticidas sintéticos altamente tóxicos e de amplo espectro de ação, que resulta em consequências graves ao ser humano e ao meio ambiente, além de causar o aparecimento de populações de insetos resistentes (VILARINHOS et al., 1998).

O controle do mosquito é realizado principalmente com produtos químicos, como organofosforados, carbamatos e piretroides. A utilização desses produtos, no entanto, tem sido limitada porque são inespecíficos, poluem o meio ambiente e seus insetos-alvo estão desenvolvendo resistência. Essa situação levou ao desenvolvimento de inseticidas biológicos usando bactérias, fungos, vírus e outros organismos alternativos, e outras classes de inseticidas químicos (PALCHICK, 1996).

Portanto, a ênfase deste estudo está no uso de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus*, devido ao seu alto grau de especificidade e segurança ambiental, sendo, portanto, particularmente adequado e ecologicamente correto para o controle do *A. aegypti* em estágio larval e no desenvolvimento de um novo repelente sintético, com tecnologia nacional, e que possa ser produzido em grande escala quando a situação assim requerer.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

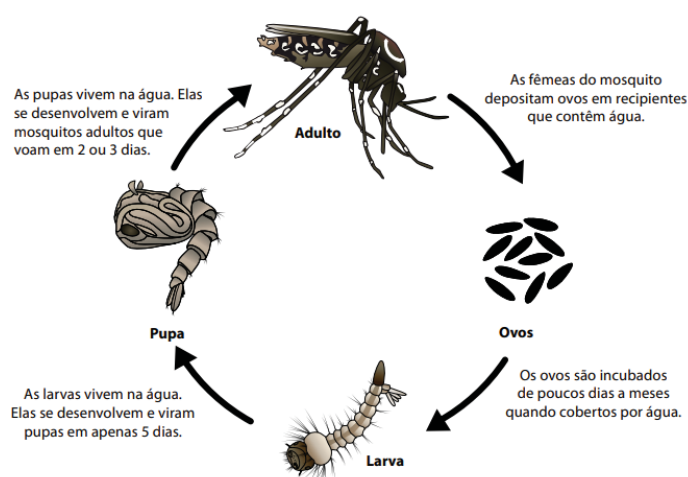
2.1. Espécie *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e seu ciclo de vida

A ordem *Diptera* compreende cerca de 130.000 espécies conhecidas, subdivididas em 125 famílias, agrupadas em duas subordens *Brachycera* e *Nematocera*, sendo que na segunda encontra-se a família *Culicidae* (mosquitos e pernilongos) com aproximadamente 3.000 espécies, na qual estão incluídos os mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, principais vetores transmissores de patógenos de endemias (classificação dada para doenças que ocorrem com frequência em uma região delimitada e se mantêm restritas à ela) no Brasil, causadores respectivamente da dengue e febre amarela, malária e filariose (elefantíase). Estes insetos possuem ampla distribuição estando presentes nos diferentes habitats: florestais, rurais e urbanos (MARCONDES, 2001).

No Brasil, o principal transmissor da dengue é o mosquito *A. aegypti* (Linnaeus, 1762), pertencente ao Filo *Arthropoda*, Ordem *Diptera*, Família *Culicidae*, Gênero *Aedes* (BRASIL, 2000).

A espécie *A. aegypti* é originária do Egito, sua dispersão pelo mundo ocorreu da África para as Américas e depois para a Ásia, é uma espécie considerada cosmopolita (espécies com ampla distribuição geográfica, geralmente abrangendo mais de um ecossistema e continente), pois atualmente encontra-se distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BRASIL, 2000). O mosquito possui um padrão de cor característico, com listras e manchas brancas em um corpo preto (PORT, 2016).

O ciclo de vida do *A. aegypti* inicia-se após a deposição dos ovos por uma fêmea na parede de um criadouro com água, após a eclosão do ovo, torna-se larva. Como o *A. aegypti* é um inseto holometabólico (que sofrem metamorfose completa durante seu ciclo de vida), a fase larval é um período de nutrição e desenvolvimento pelo qual as larvas passam a maior parte do tempo se alimentando de matéria orgânica acumulada nas laterais ou no fundo de recipientes. As larvas possuem quatro estágios evolutivos, chamados de instar. Elas são compostas por cabeça, tórax e abdômen, possuem movimento em forma de serpente, movendo-se em S ao se deslocarem, são sensíveis a movimentos bruscos na água e sob feixe de luz deslocam-se com rapidez buscando refúgio no fundo do recipiente (fotofobia). Para respirar as larvas vão à superfície onde permanecem em posição vertical (BRASIL, 2000).

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Ciclo de vida do mosquito Aedes aegypti*. Link: stacks.cdc.gov. Acesso em 20 Ago 2019

Após passar pelos quatros estágios, a larva se torna pupa, o período compreendido entre a eclosão e a pupação gira em torno de cinco dias. A fase de pupa destaca-se pela inexistência de alimentação e pela metamorfose que marcará o início da fase adulta. Esse período dura em média três dias e, durante esse tempo, a pupa permanece na superfície da água para facilitar o voo quando adulto (PORT, 2016).

A fase adulta é a mais conhecida, uma vez que é a fase em que o *A. aegypti* pode transmitir doenças ao homem. O macho, como o de qualquer espécie, alimenta-se exclusivamente de néctar e seiva de plantas. Já a fêmea, no entanto, necessita de sangue para o amadurecimento dos ovos que são depositados separadamente nas paredes internas de objetos, próximos as superfícies de água limpa, local que lhes oferece melhores condições de sobrevivência (PORT, 2016). As fêmeas preferem o sangue humano como fonte de proteína ao de qualquer outro animal vertebrado. Atacam de manhãzinha ou ao entardecer. Sua saliva possui uma substância anestésica, que torna quase indolor a picada. (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE, 2015)

O mosquito, para picar, é atraído pelo calor, pela transpiração, pelo odor corporal e pela respiração. A fêmea introduz o probóscide na pele, até atingir um vaso sanguíneo. Em seguida, injeta a saliva (que contém uma proteína anticoagulante para evitar que o canal fique entupido pela coagulação) e começa a sugar o sangue. Uma fêmea pode sugar, se não for espantada, até cinco microlitros de sangue, que é a capacidade do seu abdômen. Quando vai embora, deixa um pouco de saliva na pele de quem foi picado, que provoca coceira e pequeno inchaço ao redor da picada. Um único mosquito (fêmea) pode picar até

300 pessoas nos seus 30 dias de vida e tem uma postura de 300 ovos. A temperatura ideal para o mosquito agir reside entre 26° e 28° C, acima de 42° C, ele morre (COSTA; FERREIRA, 2002).

O *A. aegypti* é o principal transmissor da dengue, chikungunya e zika, sendo capaz também de transmitir a febre amarela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O processo de dispersão do mosquito tem ocorrido principalmente de forma passiva, através da disseminação de ovos resistentes à dessecação que podem ficar aderidos à parede interna de recipientes por até 450 dias (FORATTINI, 1962; NATAL, 2002).

Atualmente, existem várias pesquisas buscando desenvolver uma vacina eficaz contra o vírus da dengue, sendo considerada uma prioridade pela OMS – Organização Mundial de Saúde. No entanto, o desenvolvimento da mesma tem frustrado a comunidade científica devido à necessidade dessa vacina ter que imunizar contra os quatro 4 tipos de dengue e com alta eficiência, para evitar o mecanismo fisiopatológico que desencadeia a dengue hemorrágica (FIGUEIREDO, 1999).

Logo, enquanto não há uma vacina de alta eficiência, a única forma de prevenção existente consiste no controle do mosquito que pode ser efetuado por controle biológico, mecânico e químico.

- I. Controle biológico: utilização de animais predadores e/ou parasitas os quais mostraram viabilidade técnica de controle, dentre eles estão incluídos os peixes larvófagos, as bactérias, mosquitos geneticamente modificados e os hormônios reguladores de crescimento.
- II. Controle mecânico: consiste na adoção de práticas capazes de eliminar o vetor e os criadouros ou reduzir o contato do mosquito com o homem. As principais atividades de controle mecânico envolvem a proteção, a destruição ou a destinação adequada de criadouros, drenagem de reservatórios e instalação de telas em portas e janelas.
- III. Controle químico: consiste no uso de produtos químicos, na tentativa de reduzir e/ou eliminar as larvas e os adultos do *A. aegypti*. O controle químico apresenta-se dividido em controle focal, em que está incluso o uso de larvicidas perifocal, como o uso de inseticidas e de nebulização (FIGUEIREDO, 1999).

2.2. Dengue: aspectos gerais

A dengue é uma das doenças infecciosas mais frequentes no Brasil e um dos principais problemas de saúde pública no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. O vírus da dengue é um arbovírus. A classificação "arbovírus" engloba todos aqueles transmitidos por artrópodes, ou seja, insetos e aracnídeos. Existem quatro tipos de vírus de dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4).

A transmissão se faz pela picada dos mosquitos *A. aegypti*, no ciclo ser humano – *A. aegypti* – ser humano. Após um repasto de sangue infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus.

No mosquito, após um repasto de sangue infectado, o vírus vai se localizar nas glândulas salivares da fêmea, onde se multiplica depois de 8 a 12 dias de incubação. A partir desse momento, é capaz de transmitir a doença e assim permanece até o final de sua vida (de 6 a 8 semanas) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A partir do ano de 1916 o *A. aegypti* passou a provocar epidemias de dengue no Brasil e logo em seguida, o combate ao mosquito foi sistematizado e intensificado no país, com o objetivo de reduzir o número de casos que haviam levado milhares de pessoas a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

No início da década de 80, foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 no Estado de Roraima, com cerca de 11.000 pessoas infectadas. Em seguida, foram registradas várias epidemias e surtos em diversas regiões do Brasil, como a sudeste e nordeste, com o sorotipo DEN-1 como o fator causal dessas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A circulação do DENV-3 foi identificada, pela primeira vez, em dezembro de 2000, também no estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, no estado de Roraima, em novembro de 2001. Em 2002, foi observada a maior incidência da doença, quando foram confirmados cerca de 697.000 casos, refletindo a introdução do sorotipo 3. Essa epidemia levou a uma rápida dispersão do DENV-3, para outros estados, sendo que, em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A partir de 2006, alguns estados apresentaram a recirculação do DENV-2, após alguns anos de predomínio do DENV-3, e desta maneira disseminou-se os 4 tipos de sorotipos de dengue no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Em 2017, foram processadas 1.453 amostras para identificação do vírus de dengue, sendo 536 positivas, sendo, 291 (54,3%) para DENV-2, 215 (40,1%) para DENV-1, 23 (4,3%) para DENV-4 e 7 (1,3%) para DENV-3. Os resultados das amostras conclusivas mostram uma predominância do DENV-2, sobre os outros sorotipos, especialmente o DENV-1, que foi dominante desde 2009. Na região Centro-Oeste foi visto a predominância do DENV-2 e outras regiões ainda prevalece o DENV-1. As evidências apontam para uma mudança de sorotipo circulante, de DENV-1 para DENV-2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), sendo esta evidência confirmada em 2019, podendo-se afirmar que a maioria dos sorotipos identificados foram do tipo DENV-2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

2.3. Chikungunya, Zika e Febre amarela – Aspectos Gerais

Febre Chikungunya é uma doença parecida com a dengue, causada pelo vírus CHIKV, da família *Togaviridae*, seu modo de transmissão é pela picada do mosquito *A. aegypti* infectado e, menos comumente, pelo mosquito *Aedes albopictu* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

A febre chikungunya teve seu vírus isolado pela primeira vez em 1950, na Tanzânia. Ela recebeu esse nome pois chikungunya significa “aqueles que se dobram” no dialeto Makonde da Tanzânia, termo este usado para designar aqueles que sofriam com o mal. A doença, apesar de pouco letal, impõe uma série de limitações ao paciente que tem dificuldade de movimentos e locomoção por causa das articulações inflamadas e doloridas, daí o “andar curvado” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Nas Américas, em outubro de 2013, teve início uma grande epidemia de chikungunya em diversas ilhas do Caribe. No Brasil, os primeiros casos foram identificados em Oiapoque, estado do Amapá (Norte), e Feira de Santana, estado da Bahia (Nordeste), em setembro de 2014 (NUNES, et. al, 2015).

A realidade brasileira favoreceu a introdução e a expansão desse vírus. O *A. aegypti* pode ser localizado em mais de 4.000 municípios, e o *A. albopictus*, em 3.285 (CARVALHO, et. al, 2014). Acrescenta-se a alta dispersão vetorial, um amplo fluxo de pessoas e a suscetibilidade da população à infecção. Com a introdução da doença no Brasil, delineou-se um cenário marcado pela coexistência de arboviroses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O aumento dos números de casos de chikungunya, com o registro de casos graves e a ocorrência de óbitos, refletiu-se em maior demanda por serviços de saúde

e crescente necessidade de recursos financeiros e humanos, no intuito de minimizar seus efeitos na sociedade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus (do inglês, ARthropod-BORne VÍRUS) do gênero *Flavivirus*, transmitido no Brasil pelo mosquito *A. aegypti*. No entanto, outras espécies de *Aedes* já foram confirmadas como transmissoras em diferentes locais do mundo. Este vírus foi isolado inicialmente na floresta de Zika na Uganda em 1947 em macaco Rhesus, sendo que a primeira infecção humana foi documentada apenas em 1954. Até 2006, apenas 14 casos humanos haviam sido documentados na literatura médica, sempre como casos esporádicos. Até que no ano de 2007, a primeira epidemia conhecida ocorreu na ilha de Yap (Micronésia, Oceania) com 49 casos confirmados laboratorialmente (CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

No primeiro semestre de 2015, a transmissão do vírus Zika foi documentada no Brasil. Em seguida, outros países da América relataram a transmissão do vírus, sendo que até a presente data, mais de 61 países e territórios no mundo já confirmaram transmissão vetorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Existem três formas principais de transmissão do Zika vírus: transmissão pela picada do mosquito *A. Aegypti*; transmissão sexual e transmissão de mãe para o feto durante a gravidez (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

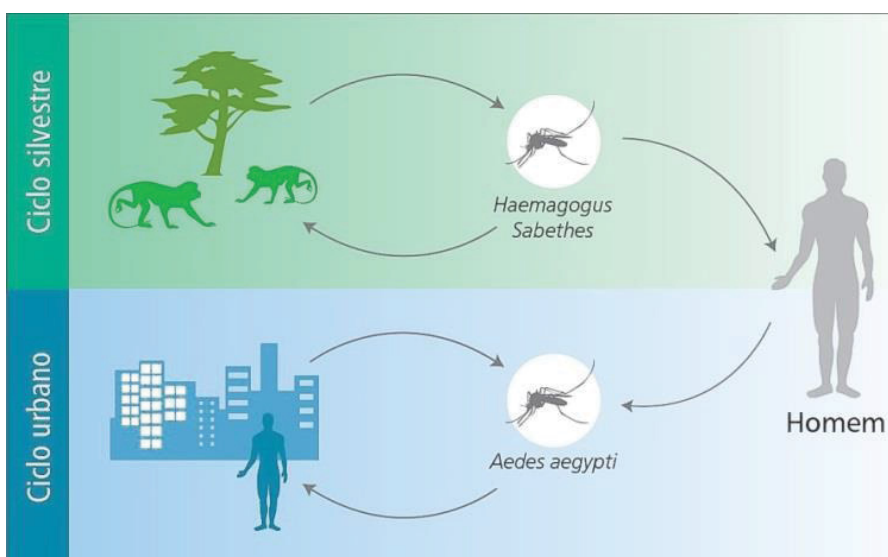
No caso de o feto ser infectado durante a gestação, este pode desenvolver lesões cerebrais irreversíveis e ter comprometida, definitivamente, toda a sua estrutura em formação. As doenças neurológicas, especialmente nas crianças com a doença congênita (infectados no útero materno), têm sequelas de intensidade variável, conforme cada caso. O comprometimento nesses casos é tão importante que algumas crianças, ao nascerem, têm microcefalia, uma deformação dos ossos do cabeça, sinal do não crescimento adequado do encéfalo (cérebro) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Não há evidências de transmissão do vírus Zika por meio do leite materno, assim como por urina e saliva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Já a febre amarela é uma doença infecciosa febril aguda transmitida por vetores artrópodes e causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, (do latim flavus = amarelo). A doença foi responsável por grande número de mortes entre o século XVIII e o início do século XX, com repetidas epidemias nas regiões tropicais da América do Sul e na África, seguidas por surtos em locais mais distantes como América do Norte, Caribe e Europa. A identificação do *A. aegypti* como transmissor do vírus, em 1900, foi

seguida por ações de controle do vetor que resultaram em significativo declínio da doença fora das áreas tropicais endêmicas (AMB, 2017).

A principal fonte de infecção são os macacos, principais hospedeiros e amplificadores do vírus, particularmente macacos dos gêneros *Allouata* (macaco guariba), *Cebus* (macaco prego), *Atelles* e *Callithrix*. Outros mamíferos podem ser reservatórios como alguns marsupiais (mamíferos que possuem característica pela presença de bolsa ventral, que se destina a receber os filhotes depois do nascimento - Tipos principais: o canguru, o gambá, o cangambá, estes últimos existentes no Brasil) e roedores. Os seres humanos não imunes podem, acidentalmente, se infectar, penetrando em áreas com probabilidade de animais infectados (AMB, 2017). O vírus da febre amarela apresenta dois ciclos epidemiológicos de transmissão distintos, silvestre e urbano, conforme a figura 2.

FIGURA 2- CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE AMARELA NO BRASIL



GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE – 2016

Os primeiros registros da doença no Brasil remontam a 1685, quando uma primeira epidemia da doença foi registrada em Recife (PE) (AMB, 2017). A introdução da vacina contra a febre amarela no país aconteceu em 1937, o intenso combate ao vetor e a imunização em massa na década seguinte levaram à eliminação da doença nas áreas urbanas no Brasil. O registro dos últimos casos da febre amarela urbana no país ocorreu na cidade de Sena Madureira (AC), em 1942 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Mas dados da Organização Mundial de Saúde - OMS apontam que a doença retornou de forma vigorosa, na primeira onda de febre amarela, entre 2016 e 2017, foram confirmados 778

casos e 262 mortes. Já na segunda, entre 2017 e 2018, foram contabilizadas 1 376 infecções, com 483 óbitos e a OMS já alerta para possível 3ª onda de surto da febre amarela. O período classificado como sazonal para o aparecimento ou aumento de casos da doença no Brasil geralmente ocorre entre dezembro e maio (AGÊNCIA BRASIL, 2019).

O vírus é mantido na natureza por transmissão entre primatas não humanos (PNH) e mosquitos silvestres arbóreos, principalmente dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (no Brasil) e *Aedes* (*Stegomyia*) na África, situação denominada epizootia (doença que apenas ocasionalmente se encontra em uma comunidade animal, mas que se dissemina com grande rapidez e apresenta grande número de casos).

Em momentos com as condições ideais para transmissão, um número maior de PNH adoece e morre, chamando atenção da sociedade na forma de epizootia, que representa o evento sentinela (alerta), e define medidas de intensificação de vacinação nos moradores das regiões afetadas. Estima-se que o número de animais infectados aumenta em intervalos cíclicos dependentes do crescimento da população susceptível de macacos em determinadas regiões, além da densidade de vetores nas matas.

Seres humanos podem ser infectados esporadicamente quando adentram a mata para trabalho ou turismo e são picados pelo mosquito silvestre infectado, apresentando a chamada febre amarela silvestre, que pode ocorrer em surtos maiores ou menores, de acordo com o número de indivíduos não imunes expostos. Sendo a febre amarela silvestre uma zoonose (doença que se manifesta sobretudo em animais), sua transmissão não é passível de eliminação, necessitando de vigilância e manutenção das ações de controle (especialmente por meio de cobertura vacinal adequada). Uma pessoa com febre amarela silvestre pode, porém, ser fonte para um surto da chamada febre amarela urbana, transmitida principalmente pelo *A. aegypti*, mosquito que vive nas cidades.

Os grandes desafios que se apresentam aos profissionais de saúde durante um surto de febre amarela silvestre são: oferecer assistência hospitalar de alta complexidade aos pacientes graves, vacinar em curto espaço de tempo grande número de pessoas não vacinadas nos locais de ocorrência da doença e controlar assim a infecção, evitando a expansão para áreas urbanas, em áreas infestadas por mosquitos do gênero *Aedes sp.* e com baixa cobertura para a vacina febre amarela ou baixa homogeneidade de cobertura vacinal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

2.4. Inseticidas

O uso de inseticidas possui ação fisiológica sobre organismos vivos, logo, todo composto químico ou natural capaz de combater insetos é denominado inseticida (PANZA, 2015).

A utilização de inseticidas para controle de populações de mosquitos adultos (adulticidas) e na sua forma larvária (larvicidas) se dá por meio do tratamento focal e perifocal e aspersão aeroespacial de inseticidas em UBV - ultrabaixo volume (ZARA *et al.*, 2016).

O tratamento focal ocorre aplicando-se um produto larvicida, que pode ser químico ou biológico, nos depósitos onde encontram-se as larvas que não possam ser eliminadas mecanicamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ZARA *et al.*, 2016).

Já o perifocal se baseia na aplicação de uma camada de adulticida de ação residual, utilizando-se um aspersor manual, nas paredes externas dos criadouros situados em pontos estratégicos (ZARA *et al.*, 2016). Esse tratamento está indicado para localidades recém-infestadas com o objetivo de complementar o tratamento focal em pontos estratégicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; ZARA *et al.*, 2016).

O de aspersão aeroespacial de inseticidas em UBV, é feito com equipamento portátil costal ou acoplado a veículos, e tem como função específica eliminar formas adultas de *A. aegypti*, e deve ser utilizado somente para bloqueio de transmissão e para controle de surtos ou epidemias. Essa nebulização não é seletiva, promovendo a eliminação de qualquer mosquito que esteja no ambiente, e seu uso indiscriminado para combate de outros insetos não é recomendado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

No mercado brasileiro uma variedade de produtos e marcas de inseticidas líquidos, em pó, em pasta e até elétricos, com uma grande diversidade de princípios ativos, o que acarreta possíveis riscos às pessoas. O consumidor é atraído pela mídia, que oferece esses produtos como protetores da saúde e como um sinônimo de limpeza (AUGUSTO; CARNEIRO; MARTINS, 2005).

Mas o surgimento de cepas resistentes aos inseticidas faz com que o consumidor insista no uso, aumentando o risco de intoxicação. A resistência a pesticidas tem sido documentada em mais de 100 espécies de mosquitos, sendo alguns deles importantes na área da saúde (CASTRO; ROZEMBERG, 2015).

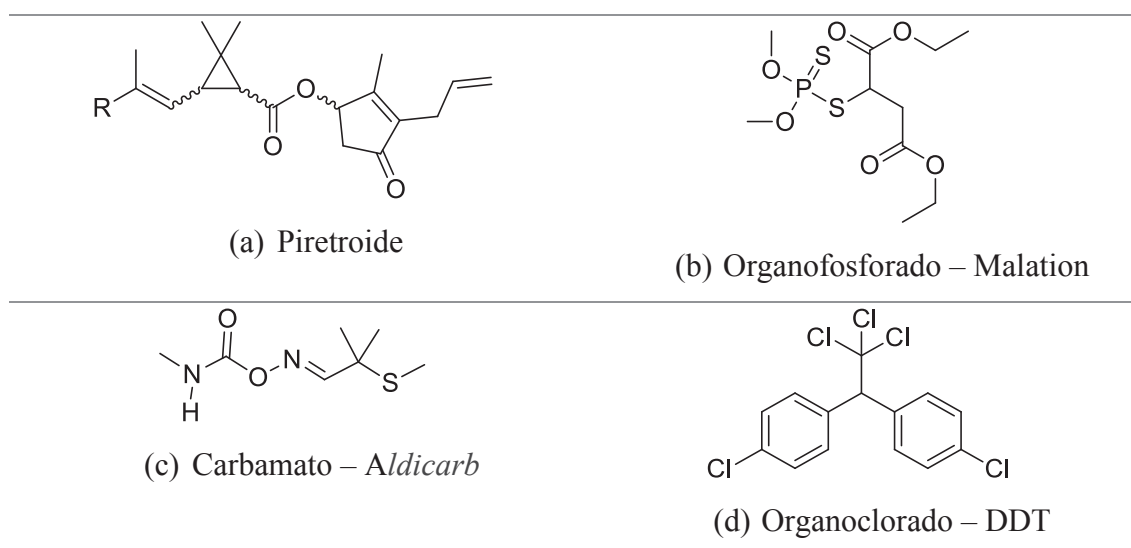
Há mais de trinta anos questiona-se, por exemplo, a aspersão de pesticidas no ambiente para o controle urbano da dengue. Seu uso prolongado acarreta o

desenvolvimento de resistência por parte das espécies e a contínua expansão do número de casos da doença – que se propôs a controlar – em diversas localidades do planeta (AUGUSTO; CARNEIRO; MARTINS, 2005).

A precariedade da forma com que, em geral, as substâncias químicas são utilizadas em nosso país, bem como o uso simultâneo de várias delas, geralmente em grandes quantidades, aponta a existência de risco elevado, que pode se tornar, num curto espaço de tempo, um problema de gravíssimas consequências para a saúde pública e para o meio ambiente (PERES; MOREIRA, 2003). E o consumidor, na maioria das vezes, desconhece as propriedades tóxicas dos componentes dessas formulações (princípio ativo, solvente e sinergistas). A falta de preocupação e o desconhecimento da toxicidade dos produtos utilizados, por parte de diferentes segmentos sociais, foi uma constatação geral em estudos de Londres (2011).

Os inseticidas químicos utilizados para o controle de mosquitos são classificados de acordo com as suas estruturas químicas em quatro principais grupos: piretroides, organofosforados, carbamatos e organoclorados, sendo que os dois primeiros são os mais frequentemente utilizados no controle de vetores (FRADIN, 2002; ANDRADE, 2008).

FIGURA 3 – ESTRUTURAS REPRESENTANDO AS PRINCIPAIS CLASSES DE INSETICIDAS QUÍMICOS



Os inseticidas piretroides são absorvidos pela pele, por inalação e pelo trato gastrintestinal. Com relação à sua ação tóxica, foi determinado experimentalmente, em ratos, efeitos neurológicos, provocando um quadro de agressividade nos animais, com tremores e um estágio final de intoxicação consistindo em espasmos convulsivos, falta de

coordenação e prostração. Estas intoxicações podem ocorrer com exposição a curto, médio ou longo prazo, podem ser crônicas ou agudas e de caráter accidental ou intencional, sendo que a velocidade e quantidade de absorção nas diferentes vias serão determinadas pelas propriedades físico-químicas do agente tóxico, da formulação empregada e por fatores fisiológicos e anatômicos do organismo atingido (PAIVA; MENEZES, 2003).

Os compostos organofosforados e carbamatos são inibidores da colinesterase, impedindo a inativação da acetilcolina (CALDAS, 2000). O principal alvo para a ação desses agentes neurotóxicos é a enzima AChE, que controla as ações centrais e periféricas do neurotransmissor acetilcolina (ACh). Esses compostos inibem irreversivelmente a AChE, que deixa de hidrolisar a ACh, levando a um acúmulo desta nas sinapses centrais e periféricas, promovendo hiperestimulação colinérgica, que resulta em broncorreia, contração muscular e cardíaca, convulsões, depressão respiratória e morte (TAFURI; ROBERTS, 1987).

Já os pesticidas organoclorados são substâncias altamente resistentes à degradação tanto por meios químicos ou biológicos, são pouco solúveis em água, semi-voláteis e, como são muito lipossolúveis, se acumulam nas gorduras dos organismos, percorrem rapidamente a cadeia alimentar causando mais danos aos carnívoros. Além disso, são secretados no leite materno e penetram a placenta. Atualmente a maioria dos organoclorados tem uso restrito ou foram definitivamente proibidos no Brasil, assim como em várias partes do mundo (CIRCUNVIS, 2017).

A inalação de DDT (diclorodifeniltricloroetano) atua nos receptores GABA_A causando depressão da atividade de sistema nervoso central, seguida de tremores e, possivelmente, convulsões. Também causam sérias lesões hepáticas, renais, cardíacas e pode causar câncer de estômago e pulmão tanto em humanos quanto em outros animais (PINHEIRO; MONTEIRO, 1992).

Em razão da ocorrência de resistência em amostras de populações de *A. aegypti* a certos inseticidas, o Programa Nacional de Controle da Dengue - PNCD vem, ao longo dos anos, promovendo substituições. Os organofosforados (malationa, fenitrothion e temefós) foram os primeiros a substituir os organoclorados. Por sua vez, os piretroides (cipermetrina e deltametrina) têm sido usados como alternativa para substituição dos organofosforados, por sua alta eficiência contra mosquitos adultos, sendo necessárias menores quantidades de produto ativo. Além do impacto ambiental, a desvantagem está no alto custo dos piretroides (GUZMAN, 2010). O monitoramento da susceptibilidade a inseticidas em diferentes áreas do país é uma estratégia racional importante para ampliar

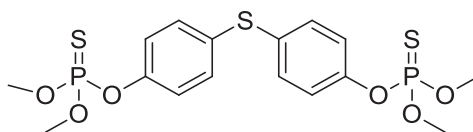
o conhecimento sobre os mecanismos de resistência e para o controle dos níveis de infestação vetorial em âmbito local (BRAGA; VALLE, 2007).

2.4.1. Larvicidas

Larvicidas químicos e biológicos são bastante estudados, dentre eles encontram-se os mais recomendados para o controle da larva de *A. aegypti* (RIBEIRO JÚNIOR, 2007), o organofosforado temefós, o *Bacillus thuringiensis israelenses* - Bti e os reguladores de crescimento de insetos, como o *N* - [(4-clorofenil) carbamoil] -2,6-difluorobenzamida (diflubenzuron).

O organofosforado temefós (FIGURA 4) foi introduzido no mercado em 1965, sendo o único larvicida do grupo com uso generalizado no controle de larvas de mosquito, por mais de 40 anos (GAINES, 1969).

FIGURA 4 – ESTRUTURA DO TEMEFÓS

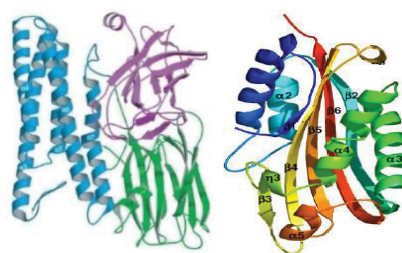


Ele era o único do grupo aprovado pela OMS para uso em água de consumo humano, isso por ser de baixa toxicidade aguda e apresentar pouca persistência no ambiente, entretanto, desde 1999 foi sendo detectada resistência do vetor a esse larvicida e, em 2012 foi recomendada por especialistas a interrupção do uso do mesmo. Portanto, o temefós foi sendo utilizado de maneira restrita em 2013 e a partir de 2014 não foi mais utilizado (WHO, 2014).

Depois da detecção da resistência do *A. aegypti* ao temefós, em 1999 no Brasil esse organofosforado foi sendo substituído por outras formas de controle, e entre elas se destacam o uso do *Bacillus thuringiensis israelensis* - Bti e os reguladores de crescimento de insetos – (do inglês IGR).

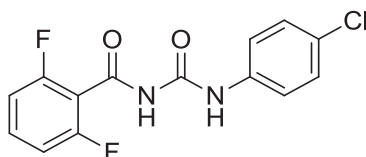
O *Bacillus thuringiensis israelensis* - Bti foi descoberto em 1976. Testes comprovaram sua atividade tóxica para larvas, pelo fato de produzir diferentes toxinas, dentre elas: Cry (cristal tóxico), e uma toxina com atividade citolítica (causa a ruptura de células) e hemolítica, Cyt (FIGURA 5) (BRAGA, 2007)

FIGURA 5 - ESTRUTURAS ESQUEMÁTICA DAS PROTEÍNAS Cry E Cyt



BELTRÃO, 2016

Já o diflubenzuron (regulador de crescimento de inseto) (FIGURA 6), é um inseticida da classe benzoilureia, sintetizado e utilizado no controle efetivo de várias espécies de insetos.

FIGURA 6 - *N* - [(4-CLOROFENIL) CARBAMOIL] -2,6-DIFLUOROBENZAMIDA (DIFLUBENZURON)

O diflubenzuron é um potente inibidor da síntese da quitina provocando morte do inseto em consequência da má formação da cutícula. Após ingerir o inseticida, as larvas têm dificuldades na mudança periódica de pele. A consequência disso é que a cutícula mal formada pode não suportar a pressão interna durante a troca de pele, ou não conseguir dar suficiente suporte aos músculos envolvidos, resultando na incapacidade de liberar os restos deixados pelo inseto e consequentemente, morte das larvas (ALMEIDA, 2008).

2.4.1.1. Larvicida - *Bacillus thuringiensis israelenses* – Bti

O *Bacillus thuringiensis israelenses* - Bti foi descoberto em 1976, em solo israelenses, essa cepa foi isolada por Goldberg e Margalit a partir do intestino de larvas moribundas de *Culex*, e os produtos comerciais logo depois chegaram ao mercado. Possui diferentes toxinas: Cry (cristal tóxico), e uma Cyt (toxina com atividade citolítica e hemolítica) (BECKER, 2000).

Outro fato importante é a possibilidade do Bti ser usado juntamente com produtos químicos para aumentar a eficiência do controle, no caso, durar mais tempo em campo, o que já ocorre (CHUI; WONG; TSOI, 1995).

Em contraste com os inseticidas químicos, o Bti apresenta baixa toxicidade para os seres humanos, outros mamíferos e animais aquáticos, características importantes, uma vez que os agentes de controle são geralmente aplicados em áreas urbanas e também se sobressai devido ao baixo impacto ambiental, uma vez que seu modo de ação é seletivo. Os principais alvos são espécies dos gêneros *Aedes*, *Simulium*, *Culex* e *Anopheles* (BECKER, 2000).

De acordo com Becker (2000), todos os estudos feitos após a introdução da Bti mostram que ocorreu um controle eficiente, sem que ocorressem danos ao ambiente, não havendo redução da biodiversidade dos locais tratados. As toxinas produzidas pelo Bti agem em sinergia, o que dificulta a seleção de mecanismo de resistência, sendo esta característica uma das principais vantagens deste entomopatógeno. Ensaio de seleção de larvas de culicídeos (pernilongo), sob condições de laboratório, utilizando toxinas individuais ou combinações de duas ou três toxinas, mostraram que o desenvolvimento de resistência é inversamente proporcional ao número de toxinas empregado na seleção (GEORGHIOU; WIRTH, 1997). No caso dos inseticidas químicos, já foi amplamente registrada a ocorrência de resistência de vetores às diversas classes de inseticidas utilizados (HEMINGWAY; RANSON, 2000). O Bti apresenta um modo de ação extremamente eficaz e uma complexidade de proteínas que o faz único dentre os demais agentes de controle biológico.

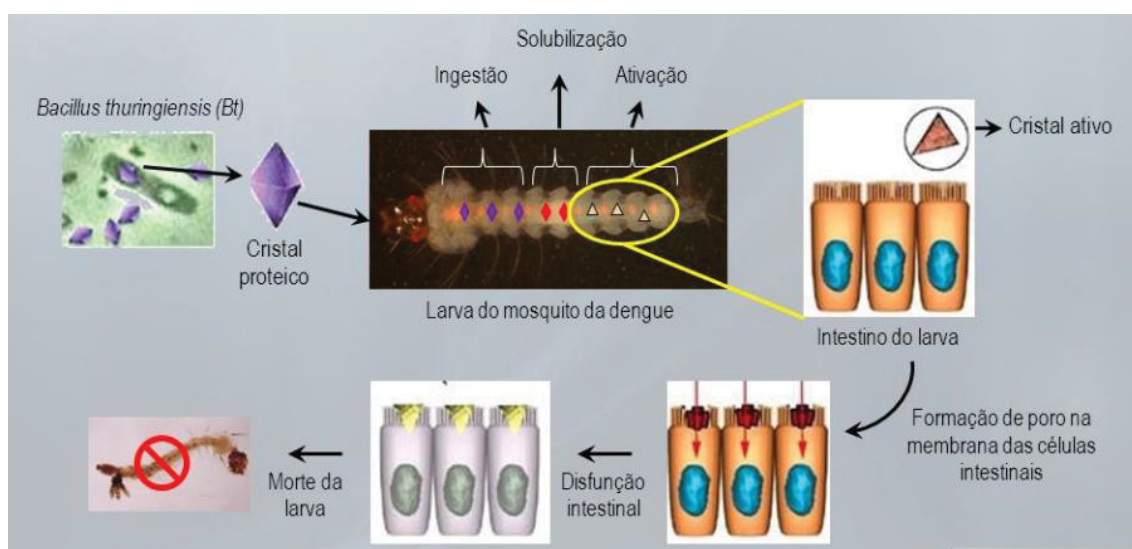
Em 1983, os primeiros estudos conduzidos no Brasil avaliaram a eficiência de agentes biológicos no controle de simulídeos (borrachudos). Em 1986, devido aos resultados promissores iniciou-se a substituição dos organofosforados por produtos à base de Bti. Desde então, tornou-se a única tática de controle de simulídeos. O Estado do Rio Grande do Sul foi pioneiro no uso de Bti (VILARINHOS et al, 1998).

Segundo Araujo-Coutinho (1995), desde 1990 a Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo vem utilizando produtos à base de Bti no programa de controle simulídeos realizados ao longo da Serra do Mar. Esta nova estratégia substituiu o programa iniciado em 1986 que utilizava temefós como agente de controle.

Os cristais de Bti, ao serem ingeridos pelas larvas dos insetos suscetíveis, sofrem ação do pH intestinal e de proteases (enzimas), que solubilizam o cristal e ativam as toxinas. Estas, por sua vez, se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do

intestino da larva, ocasionando a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que se intumescce e rompe, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal. Em consequência, a larva não consegue mais se alimentar, entra em paralisia geral e morre por inanição ou septicemia. A inibição da alimentação pode ocorrer logo após a ingestão do esporo e das toxinas das proteínas do Bti (MONNERAT; BRAVO, 2000). Na figura 7 mostra-se a atuação do Bti no intestino da larva.

FIGURA 7 - ATUAÇÃO DO BIOLARVICIDA Bti NO INTESTINO LARVAL



JURAT-FUENTES, 2008

O tempo para ocorrer a morte das larvas varia de 3 a 24 horas de exposição às proteínas do Bti (dependendo da concentração colocada do larvicida). Devido ao seu modo de ação, as proteínas do Bti apresentam uma potência biológica alta quando comparado aos inseticidas químicos (FEITELSON, 1992). Segundo SEBESTA & HORSKA (1970), as proteínas presentes nestes cristais também afetam os insetos durante suas metamorfoses, impedindo a pupação e, em alguns casos, causando o envenenamento de insetos adultos. De acordo com Lecadet e Martouret (1967), a susceptibilidade de insetos-alvo depende das suas habilidades em pré-digerir (ativar) as toxinas em questão, além do fato das atividades destas toxinas variarem quantitativa e qualitativamente, de acordo com a linhagem que dará origem ao biocida.

As toxinas citolíticas (Cyt) também são tóxicas para mosquitos, embora sua atividade seja geralmente menor do que a atividade de proteínas Cry (CHANG *et al.*, 1993). Entretanto, as toxinas Cyt agem sinergicamente com toxinas Cry, funcionando

como receptores para essas toxinas, possuindo, portanto, um papel crucial na atividade geral das inclusões paraesporais (CRICKMORE *et al.*, 1995).

Devido à importância do esporo na reciclagem do Bt – *Bacillus thuringiensis*, a maioria dos produtos comercializados é composta de esporos e toxinas, visando aumentar sua atividade tóxica (BECKER, 2000).

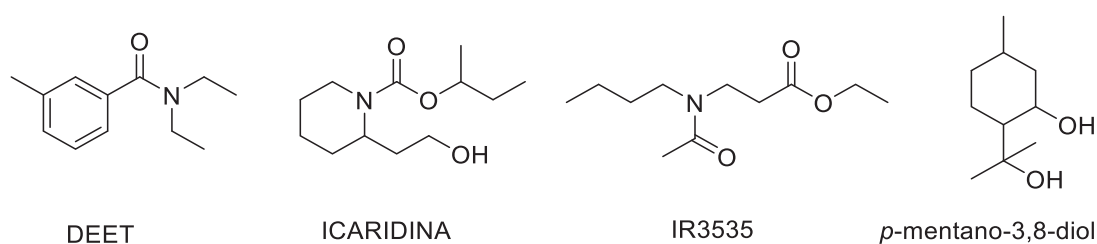
Dessa forma, o *B. thuringiensis israelenses* - Bti torna-se uma alternativa natural e eficiente para o combate ao surgimento de populações de mosquitos a nível mundial (BRAVO & SOBERÓN, 2008).

2.5. Atividade repelente

Repelentes são geralmente substâncias aplicadas sobre a pele que dificultam a aproximação de insetos, podendo ser sintéticos ou naturais.

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (inglês: Centers for Disease Control and Prevention - CDC), há quatro repelentes indicados ao uso humano, são esses: *N,N*-dietil-meta-toluamida - DEET, Icaridina/Picaridina, IR3535 e o 3,8-*p*-mentano-diol, que é a única substância natural entre os repelentes que foi isolada do óleo essencial de eucalipto citriodora (FIGURA 8).

FIGURA 8 - REPELENTES DE MOSQUITOS UTILIZADOS A NÍVEL MUNDIAL



Embora não se conheça profundamente o mecanismo de ação do DEET, e haver relatos de sua toxicidade às crianças e gestantes, (KOREN, 2003), ele é o princípio ativo sintético mais utilizado por mais de 50 anos. Segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental (AAPA), existem cerca de mais de 140 produtos à base de DEET no mercado, com concentrações desse ingrediente ativo variando, normalmente entre 5 a 15%, podendo chegar a mais de 25% (ANDRADE, 2008; ROSA, 2010). Uma formulação com cerca de 5% de DEET confere proteção por aproximadamente 90 minutos, com 7% de

DEET a proteção dura quase 2 horas e com 20% de DEET a proteção é de 5 horas (STEFANI et al, 2009).

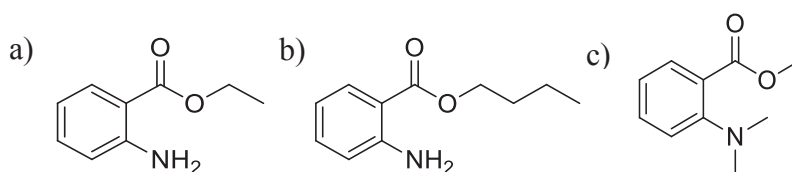
A Icaridina é um repelente derivado da pimenta, sua ação ocorre pelo “efeito de nuvem”, após a aplicação a Icaridina evapora formando uma proteção em volta da pele que repele o inseto, seu uso é recomendado por cima dos tecidos das roupas (não recomendado seu uso por baixo) ou apenas na pele exposta. Em concentração a 10%, a Icaridina confere proteção por um período de três a cinco horas, e a 20% algumas referências informam de oito a dez horas. Sua ação é comparável a concentrações de 15-50% de DEET, sem necessitar de reaplicações em intervalos menores de tempo como este último (STEFANI et al, 2009).

IR 3535 é um repelente sintético, disponível na Europa há mais de 20 anos. Usando 11% obtêm-se uma proteção aproximada de 4 horas, com 30% pode-se obter uma proteção aproximada de até 8 horas. Seu modo de ação não é totalmente conhecido e sua eficácia é comparada ao DEET, porém com menor tempo de proteção. Apresenta toxicidade oral e dérmica mais segura do que o DEET (STEFANI et al, 2009; ISLAM et al, 2016).

O óleo das folhas do eucalipto limão (*Corymbia citriodora*), constituído majoritariamente por citronelal (85%), é um dos mais eficazes entre os repelentes de origem vegetal. Um dos constituintes do óleo do eucalipto que exibe potente atividade repelente, é o PMD (*p*-mentano 3,8-diol), apresenta pressão de vapor mais baixa e evapora mais lentamente, o que assegura proteção contra mosquitos mais duradoura (várias horas). Em concentração de 30%, é comparável ao DEET 20% e confere proteção de até cinco horas, sendo o mais recomendado entre os compostos de origem natural (STEFANI et al, 2009).

Em artigo publicado na revista *Nature* (KAIN, 2013) é discutida a diversidade estrutural percebida nos repelentes e a dificuldade em se planejar o desenvolvimento de novos repelentes, o que levou os autores a estudarem os mecanismos de interação dessas substâncias com os receptores presentes no *A. aegypti*. Neste trabalho são sugeridas estruturas químicas que poderiam também atuar como repelentes, algumas dessas estruturas são ilustradas na figura 9 (KAIN, 2013).

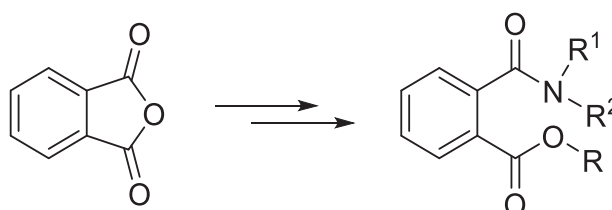
FIGURA 9 - ESTRUTURAS QUÍMICAS CANDIDATAS A REPELENTE

A) ANTRANILATO DE ETILA B) ANTRANILATO DE BUTILA C) *N, N*-DIMETILANTRANILATO DE METILA

Ressalta-se que o antranilato de etila, está presente na essência de uvas e apresenta baixa toxicidade ao ser humano e pode ser, no caso de apresentar boa eficiência, uma interessante alternativa a ser empregada como repelente (KAIN, 2013).

Analisando as estruturas das substâncias da figura 9 e comparando-as com às dos repelentes em uso, propôs-se a síntese de moléculas de estruturas correlatas, ilustradas na figura 10, nas quais poderiam ser facilmente sintetizadas diretamente a partir do anidrido ftálico, substância de menor custo que o ácido antranílico e que, em sendo ativas, poderiam se tornar alternativas interessantes aos repelentes atualmente em uso.

FIGURA 10 - ESTRUTURAS DE POSSÍVEIS REPELENTE DERIVADOS DO ANIDRIDO FTÁLICO



Ressalta-se que se pode variar tanto a porção da amina que resulta na amida, como a porção do álcool que dá origem ao éster e, desta forma, uma série de moléculas podem ser sintetizadas e terem suas atividades repelentes determinadas.

Nesse contexto, entre as ferramentas disponíveis para reduzir a população do mosquito e minimizar a possibilidade de contato deste com seres humanos, o emprego de larvicidas e de repelentes têm recebido destaque e serão objetos de estudo deste trabalho.

2.6. Ecotoxicidade e teste de toxicidade

Ecotoxicidade está relacionada ao conhecimento dos efeitos que produtos químicos lançados no meio ambiente podem ter sobre indivíduos, sobre populações e

comunidades de organismos, além de conhecer como o homem pode ser afetado. Logo, o termo ecotoxicologia pode ser entendida com a junção de ecologia e toxicidade (CHAPMAN, 2002).

A ecologia é o estudo da interação dos seres vivos e com o meio ambiente em que vivem, enquanto a toxicologia é a ciência que procura entender os efeitos causados por substâncias químicas e bioquímicas bem como os processos biológicos envolvidos nestas interações, levando em conta a sensibilidade de diferentes tipos de organismos à exposição de substâncias químicas e as relativas toxicidade das diferentes substâncias. O objetivo da ecotoxicologia seria então entender e prever efeitos de substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais (CHAPMAN, 2002).

Os testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos-teste são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos. Estes testes constituem-se basicamente na exposição de organismos à diferentes condições, as quais tentam simular o ambiente natural, visando assim detectar seus efeitos letais e/ou subletais.

A toxicidade de uma substância pode ser classificada em aguda ou crônica. A aguda é o efeito prejudicial ocasionado a organismos vivos por agentes físicos ou químicos em um curto prazo de exposição comparado ao seu ciclo de vida e resultante de testes de ecotoxicidade. A denominada crônica é efeito deletério (que destrói, corrompe) causado por agentes físicos ou químicos aos organismos vivos, que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, tais como reprodução, crescimento e comportamento, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele (CEMA, 2010).

Segundo Damato (2001) e Knie; Lopes (2004), a escolha de organismos testes fundamenta-se em alguns critérios:

- O organismo-teste representativo de um importante grupo ecológico deve ser abundante e estar disposto ao longo do ano;
- Os métodos para cultivo devem estar consolidados e relacionados às condições ambientais da espécie;
- Deve ser sensível ao agente tóxico ou a fatores ambientais;
- O efeito tóxico deve ser facilmente identificável;
- A metodologia deve ser prática, rápida, reprodutível e padronizável.

De acordo com Knie; Lopes (2004), do ponto de vista ecossistemático, a seleção das espécies representantes dos grupos para os testes de ecotoxicidade tem que levar em

consideração os diferentes níveis alimentares sendo os decompositores: bactérias; produtores primários: algas; consumidores primários: protozoários; consumidores entre os metazoários (animais pluricelulares): microcrustáceos e consumidores finais: peixes.

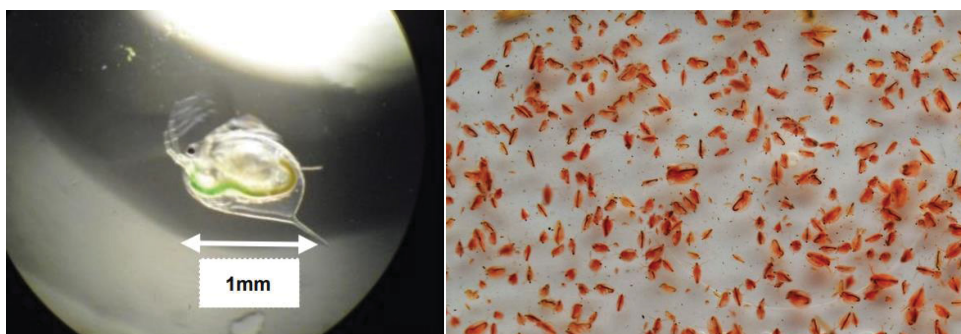
2.7. Organismos testes

2.7.1. *Daphnia magna*

Damato (2001) descreve que os organismos de água doce têm sido amplamente utilizados como indicadores biológicos devido a sua sensibilidade às variações de parâmetros ambientais.

No Brasil, são consolidados e normatizados ensaios para avaliar a toxicidade, aguda ou crônica, em espécies de água doce – tal é o caso, por exemplo, dos ensaios de toxicidade agudos com *Daphnia magna* (FIGURA 11) (COSTA et al., 2008). A realização dos ensaios de toxicidade em água doce é assegurada pela Associação Brasileira das Normas Técnicas (ABNT) por meio da NBR 12.713 (ABNT, 2016).

FIGURA 11 - *Daphnia magna*



Popularmente conhecida como pulga d'água, a *Daphnia magna* é um pequeno crustáceo que possui um tamanho médio de 1 mm em 24 h e de 5 a 6 mm depois de 72 h, e alimenta-se preferencialmente de algas. Em boas condições ambientais, se reproduz por partenogênese (reprodução assexuada de animais em que o embrião se desenvolve de um óvulo sem ocorrência da fecundação), originando numerosos descendentes geneticamente idênticos às fêmeas progenitoras o que permite eliminar a variabilidade de ordem genética dos bioensaios. (ALVES; SILVANO, 2006). Além disso, possuem de 7 a 8 semanas de vida, um tempo de maturação curto e altas taxas de reprodução, tornando-a ideal para

estudos de mudanças fisiológicas resultantes de estresse químico ou ambiental em laboratório (ACHARYA; SCHULMAN; YOUNG, 2010).

Conforme Knie; Lopes (2004), a escolha da *Daphnia magna* como organismo-teste fundamenta-se principalmente nos seguintes critérios:

- Os descendentes são geralmente geneticamente idênticos, o que assegura uma certa uniformidade de respostas;
- A cultura em laboratório sob condições controladas é fácil e sem grandes dispêndios;
- O manuseio é simples, por causa do tamanho relativamente grande da espécie, em comparação com outros microcrustáceos;
- A espécie reage sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos;
- A espécie é adequada para testes estáticos, semi-estáticos ou de fluxo contínuo;
- O ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, o que permite usar as *Daphnias* também em testes crônicos;
- A *Daphnia magna* é internacionalmente reconhecida como organismo-teste e vem sendo utilizada há décadas em estudos ecotoxicológicos.

2.7.2. *Scenedesmus subspicatus*

As algas *Scenedesmus subspicatus* são produtores primários, tanto em ambientes aquáticos marinhos como em água doce e são capazes de responder a efeitos tóxicos de diversas substâncias. Foram um dos primeiros organismos indicadores de toxicidade sendo utilizadas há mais de 100 anos (KNIE; LOPES, 2004).

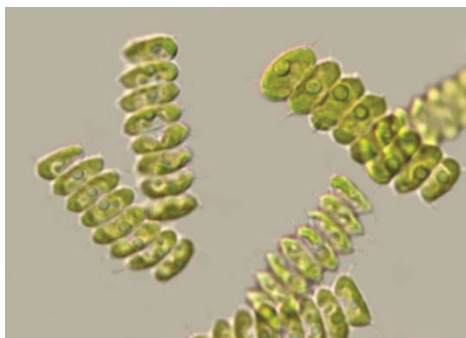
Outra vantagem de se utilizar estes organismos em ensaios de toxicidade é sua grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e ao fato de possuírem um ciclo de vida relativamente curto possibilitando a observação de prováveis efeitos tóxicos em várias gerações (KNIE; LOPES, 2004).

Para Reginatto (1998), os ensaios de toxicidade que usam algas ou plantas indicadoras consistem basicamente no crescimento destas em diferentes diluições dos efluentes ou substância a ser avaliada, na qual é adicionada uma solução de nutrientes de composição definida. A duração do ensaio varia conforme a espécie-indicadora e pode ser de algumas horas até sete dias, período no qual são comparados parâmetros como biomassa, concentração de clorofila, atividade fotossintética e/ou crescimento em relação ao controle.

O Brasil possui uma norma técnica da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT a NBR 12648 Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*), para o teste com algas o qual utiliza *C. Vulgaris* ou *S. Capricornutum*. Quanto à forma de mostrar os resultados de toxicidade pode ser obtido tanto pelo cálculo de crescimento da alga ou pela determinação da sua taxa de crescimento diário num determinado período de tempo.

Scenedesmus subspicatus (*Chlorophyta*, *Chlorophyceae*) (FIGURA 12) é uma alga verde planctônica, representante dos produtores primários nos ecossistemas de água doce. Nesta função, as algas são base do ciclo de vida na água, servindo de alimento para outros organismos; além disso, destacam-se na manutenção do equilíbrio do ambiente aquático, pois participam dos ciclos biogeoquímicos (processos que ocorrem na natureza para garantir a reciclagem de elementos químicos no meio) especialmente nos do carbono, oxigênio, nitrogênio, fósforo e silício (KNIE; LOPES, 2004).

FIGURA 12 - *Desmodesmus subspicatus*



Conforme Perin (2005), os testes permitem avaliar os seguintes efeitos: a) tóxico agudo: verifica-se quando não ocorre ou quase não há o crescimento (taxa insignificativa de crescimento); b) de inibição: as algas na solução têm um atraso inicial no crescimento e depois voltam ao crescimento normal ou quase normal; c) estimulante: nesse caso ocorre crescimento maior do que no experimento controle.

Para Reginatto (1998), a importância do uso de algas como indicadores biológicos deve-se, principalmente, à posição ocupada na cadeia alimentar do ecossistema. Como principais representantes dos produtores primários tanto em ambientes aquáticos marinhos como em águas doces. Situam-se na base da cadeia alimentar e as alterações ocorridas na dinâmica da comunidade poderão afetar os níveis superiores do ecossistema. Outras vantagens da utilização destes organismos em ensaios

de toxicidade são sua grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e ao fato de possuírem um ciclo de vida relativamente curto, possibilitando a observação dos prováveis efeitos tóxicos em várias gerações (REGINATTO, 1998).

2.7.3. *Artemia salina*

Artemia salina é um crustáceo da ordem *Anostraca* (sem carapaça) (FIGURA 13) que vive em lagos de água salgada e salinas de todo o mundo, estando adaptada para sobrevivência em corpos de água que sofrem grandes variações sazonais, podendo tolerar salinidades que flutuam de 3,5 a 70 %. Por ser amplamente utilizada como alimento vivo para peixes e outros crustáceos, seus ovos podem ser encontrados com facilidade em lojas de aquaristas (SIQUEIRA, 1998).

FIGURA 13 - *Artemia salina*



A *Artemia salina* é um crustáceo filtrador que se alimenta basicamente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos dissolvidos no meio. A filtração ocorre nos toracópodes, encarregados de conduzir as partículas alimentícias em direção ao sistema digestivo. A taxa de filtração diminui com o aumento da concentração de partículas, ficando estas acumuladas e interferindo o processo normal de seus batimentos. Outro efeito das altas concentrações é que podem passar diretamente pelo tubo digestivo sem sofrer digestão, tornando o indivíduo subnutrido (SOUTO, 1991).

O ensaio de toxicidade aguda com *Artemia salina* é um teste rápido, de baixo custo, eficiente e que requer uma pequena quantidade de amostra. A simplicidade desse teste, que não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, favorece sua

utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório (SIQUEIRA et al., 1998).

Há na literatura diversos trabalhos que apresentam uma boa correlação entre os ensaios de toxicidade a esta espécie e distintas atividades biológicas, tais como, antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida, antitumoral, dentre outras (PISUTTHANAN et al 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de nova substância com atividade repelente a partir do anidrido ftálico e nova formulação com atividade larvicida baseada em proteínas do Bti, visando contribuir para o controle populacional do mosquito *A. aegypti* e para a diminuição das enfermidades causadas por esse vetor.

3.2. Objetivos Específicos

- Estudar a fotolabilidade das proteínas do Bti;
- Desenvolver formulações de comprimidos larvicidas;
- Desenvolver formulações larvicidas para serem usadas em grandes superfícies de água;
- Determinar a atividade larvicida das formulações desenvolvidas;
- Realizar o ensaio de toxidez dos produtos com ação larvicida contra alguns organismos-testes;
- Sintetizar novas moléculas candidatas a repelentes;
- Determinar a atividade repelente das substâncias sintetizados em laboratório frente ao vetor *A. aegypti*;
- Integrar os conhecimentos acumulados visando disponibilizar à população tecnologia capaz de produzir larvicida eficiente e de baixa toxidade e o primeiro repelente comercial de origem sintética produzido no Brasil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As técnicas empregadas no desenvolvimento dos trabalhos experimentais foram baseadas na literatura especializada e adaptadas, quando necessário, para obtenção de melhores resultados.

As reações foram efetuadas em meio anidro e sob atmosfera inerte quando necessário e monitoradas via cromatografia em camada delgada (CCD), e/ou via cromatografia em fase gasosa.

Os compostos foram purificados por cromatografia flash em coluna, utilizando-se gel de sílica 60 230-400 mesh Merck ou cromatografia em camada delgada preparativa utilizando gel de sílica. Os solventes empregados para a purificação das substâncias eram de grau técnico e foram destilados antes da utilização.

O material liofilizado contendo as proteínas de Bti foi enviado pelo grupo coordenado pelo Prof. Dr. João Antonio Cyrino Zequi, do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina. Os ensaios de campo da atividade larvicida foram também realizados pelo grupo coordenado pelo Dr. João Antonio Cyrino Zequi.

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono foram efetuadas em um equipamento AVANCE 200 BRUKER utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) estão reportados em partes por milhão (ppm) em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS) como referência interna. A multiplicidade dos sinais está reportada como: s – simpleto, d – duplete, dd – duplo dublete, t – tripleto, m – multiplete. Constantes de acoplamento (J) estão reportadas em Hertz (Hz) e foram calculadas utilizando o software MestReNova versão 6. 1. 0-6267.

O teste em Fitotron foi realizado no Laboratório de Madeira na Embrapa Florestas – Colombo – PR. A Câmara Fitotron® é modelo SGC 120. Sua temperatura varia de -2 °C a +40 °C ($\pm 0,3$ °C), com volume da câmara de 1200 L.

A análise morfológica do material contendo proteínas de Bti e das larvas foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) TESCAN VEGA3 LMU no Centro de Microscopia da UFPR.

4.1. Bioensaios

4.1.1. Criação das Larvas

Os bioensaios foram realizados com larvas de *A. aegypti* obtidas a partir de ovos da colônia “Rockefeller-CDC” (Center of Disease Control) e da colônia de população silvestre de procedência de Foz do Iguaçu (F3), ambas já previamente estabelecidas no insetário do Laboratório de Morfologia e Fisiologia de Culicidae e Chironomidae da Universidade Federal do Paraná (UFPR), trabalho em colaboração com o Prof. Dr. Mario A. Navarro-Silva.

Os ovos foram submersos em copos plásticos com capacidade para 770 mL preenchidos com água desclorada e adicionado 26 mg de ração triturada a fim de induzir a eclosão de larvas, à temperatura de 25 °C. Obtida a eclosão larval, mediante visualização das larvas, e passadas 24 horas, estas foram transferidas para bandejas plásticas (35,5 cm x 21,5 cm x 6,5 cm) contendo 3 L de água desclorada. Estas larvas foram mantidas sob condições de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade ($70\% \pm 10$) e fotoperíodo (12 h:12 h) controlados em câmara climatizada Modelo 347 CDG. Assim permaneceram até atingirem o estágio de 3º instar final ou 4º inicial, não sofrendo nenhum tipo de tratamento químico.

4.2. Quantificação de proteínas totais solúveis do fermentado liofilizado de Bti pelo método Biureto e Bradford

O fermentado liofilizado de Bti foi adquirido pela parceria com o prof. Dr. João A. C. Zequi da Universidade Estadual de Londrina - PR, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Laboratório de Entomologia Médica.

4.2.1. Quantificação de proteínas totais solúveis pelo método Biureto

Preparou-se uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA) (2 mg/mL). Em seguida preparou-se uma mistura com o fermentado liofilizado de Bti (10 mg) em água destilada (10 mL) (mistura 1).

Logo após, preparou-se o reagente de biureto: fez-se uma solução de tartarato de sódio e potássio pentahidratado (6 g) em água destilada (500 mL). Em seguida adicionou-

se lentamente sulfato de cobre pentahidratado (1,5 g) e solução de hidróxido de sódio 10% (300 mL), diluindo para 1L.

Feitas as soluções, preparou-se o branco (água destilada) e os tubos para a curva de calibração de acordo com a tabela 1.

TABELA 1 - SOLUÇÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Tubo	1	2	3	4	5
BSA (mL)	0,3	0,5	0,7	1,0	1,2
H₂O (mL)	1,2	1,0	0,8	0,5	0,3

Adicionou-se o fermentado liofilizado de Bti (mistura 1) (0,1 mL) em H₂O destilada (4,9 mL) e prepararam-se os tubos com essas proteínas do fermentado liofilizado de Bti (TABELA 2).

TABELA 2 - SOLUÇÕES PARA DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Tubo	6	7
fermentado liofilizado de Bti (mL)	0,2	1,0
H₂O destilada (mL)	1,3	0,5

Adicionou-se o reagente de biureto (1,5 mL) a todos os tubos e agitou-se. Após deixou-se em banho-maria à 37 °C durante 15 minutos. Leu-se a absorbância no equipamento de UV-Vis, em 540 nm, sendo o espectrômetro calibrado com o branco (água destilada) (GORNALL, A.G et al, 1949).

4.2.2. Quantificação de proteínas totais solúveis pelo método de Bradford

O ensaio de Bradford foi realizado em placa de ELISA de 96 poços, consistindo num volume final de 200 µL para cada poço da placa.

Preparou-se solução estoque de BSA (10 mg/mL). Diluiu-se 10 vezes a solução para preparar a curva de calibração. Fez-se a curva padrão com as seguintes concentrações de BSA: 0,125 µg/mL; 0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,75 µg/mL; e 1,0 µg/mL. Aplicou-se 5 µL de amostra (fermentado liofilizado de Bti) na placa. Após aplicar as amostras de proteína na placa, em triplicata, adicionou-se 195 µL de reagente Bradford. Fez-se também o branco (água destilada). As amostras foram incubadas, sob leve agitação, por 5 minutos. A leitura da absorbância foi efetuada no comprimento de onda de 595 nm no

espectrofotômetro UV-2401PC (SHIMADZU, Japão) (BRADFORD, 1976). As análises foram realizadas no Departamento de Química (Laboratório multiusuários) da UFPR.

4.3. Teste de fotolabilidade das proteínas de Bti frente à Luz UVA e UVB

Os testes de fotolabilidade (sensibilidade à luz) das proteínas de Bti, foram feitos das seguintes maneiras: para primeira exposição foram separados em eppendorfs uma mistura contendo Liofilizado de Bti (1 mg) + água destilada (10 mL). Em uma segunda exposição foram separados em tubos falcon uma mistura contendo Liofilizado de Bti (5 mg) e água destilada (50 mL). Ambas misturas foram expostas à luz UVA (360 nm) e UVB (280 nm), por 1 min, 5 min, 10 min, 30 min e 60 min. Para cada tempo de exposição foi preparada uma mistura (liof. Bti + água). O teste foi realizado em triplicata. Em seguida foram feitos os testes de bioensaios com larvas de *A. aegypti* (15) utilizando todos os sistemas expostos à luz UVA e UVB.

4.4. Teste de viabilidade dos endosporos de Bti frente a Luz UVA e UVB

Para verificar a resistência (viabilidade) dos endosporos de Bti, à luz UVA e UVB foram feitas diversas diluições utilizando o material liofilizado de Bti, as quais foram expostas à luz UVA (360 nm) e UVB (280 nm), e em seguida as diluições foram colocadas em placa de Petri utilizando meio BDA (Agar Batata Dextrose).

Primeiramente foi preparado uma mistura de água destilada (10 mL) e liofilizado de Bti (100 mg). Desta mistura, foram colocados em frascos eppendorf, 1 mL, os quais foram expostos à luz UVA (360 nm) e UVB (280 nm), por 1 min, 5 min, 10 min, 30 min e 60 min. Posteriormente foram preparadas diluições: 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-10} de cada tempo de exposição e realizado o plaqueamento em meio BDA. Esses plaqueamentos foram deixados em estufa (30 °C) durante o período da noite.

4.5. Obtenção e formulação dos comprimidos larvicidas

Os comprimidos larvicidas (TABELA 3) contendo o liofilizado de Bti, foram preparados por compressão em máquina excêntrica ERWEKA EK0 (FIGURA 14 A) no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, no Departamento de Farmácia da UFPR. O processo de obtenção (compressão direta ou indireta) (FIGURA 14 D) foi escolhido de

acordo com as características técnicas dos ingredientes das formulações propostas. A figura 14 B, ilustra as etapas envolvidas: Na compressão direta as matérias primas são padronizadas, misturadas e submetidos a compressão, já na compressão indireta há um processo intermediário (envolvendo mistura, preparo de massa, extrusão, secagem e padronização) para obtenção de um granulado com características adequadas à compressão. Os comprimidos tiveram massa final de 50 mg, com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura (FIGURA 14 C).

FIGURA 14 - A) MÁQUINA DE COMPRESSÃO DE COMPRIMIDO – ERWEKA EK0; (B) ETAPAS DO PROCESSO DE COMPRESSÃO EM MÁQUINA DE COMPRIMIR: (1) ALIMENTAÇÃO; (2) COMPACTAÇÃO; (3) COMPRESSÃO; (4) EJEÇÃO; (5) EXPULSÃO; (6) PRÉ-ALIMENTAÇÃO; COMPRIMIDOS LARVICIDAS

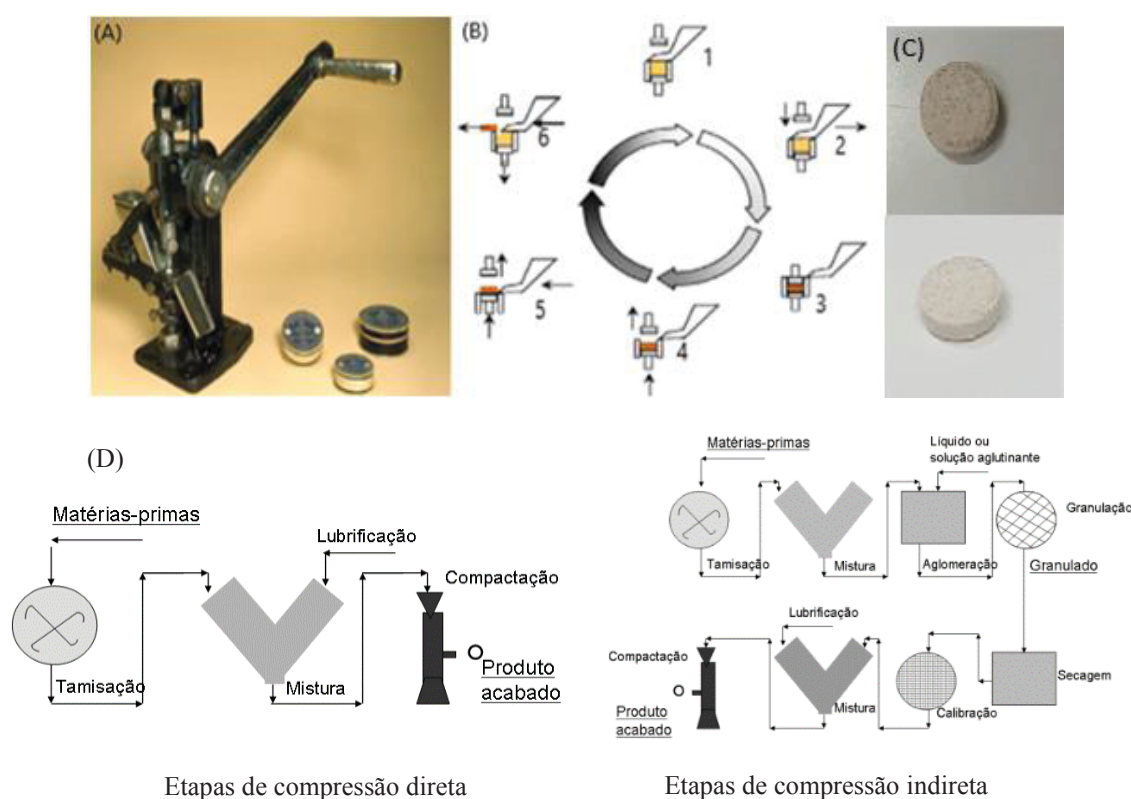


TABELA 3 - FORMULAÇÃO DOS COMPRIMIDOS PARA O TESTE DE BIOENSAIO EM CAMPO

Comprimido (50 mg)	Fermentado liofilizado de Bti (mg)	Hidroxipropil metilcelulose (HPMC)(mg)	Amido (mg)	Celulose (mg)	Estearato de magnésio (mg)
I	15	-	-	34	1
II	11,5	10	5	22,5	1
III	11,5	20	5	12,5	1
IV	30,7	4,5	7,8	6	1
% DE PROTEÍNA EM CADA COMPRIMIDO					
Comprimido (50 mg)	Fermentado liofilizado de Bti (mg)	mg real de proteína solúvel		% proteína no comprimido	

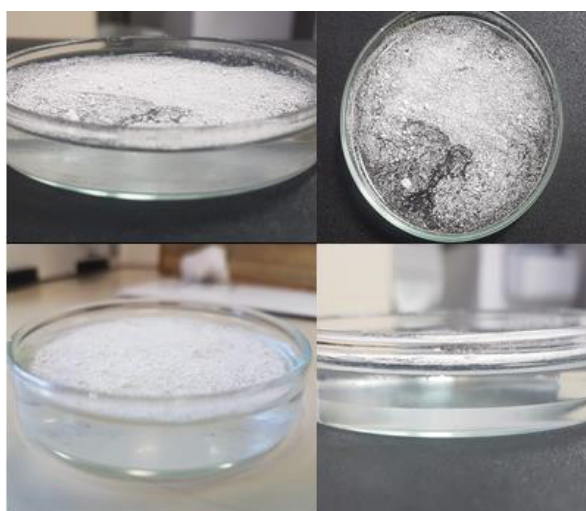
I	15	3,56	7,10
II	11,5	2,73	5,46
III	11,5	2,73	5,46
IV	30,7	7,30	14,6

4.6. Preparação do larvicida com fermentado liofilizado de Bti em forma de pó (PL)

O nome do excipiente está sendo mantido em sigilo devido à escrita da patente.

Preparou-se o larvicida em forma de pó (PL) (5% de proteína) (FIGURA 15) de duas maneiras:

FIGURA 15 - PÓ LARVICIDA EM ÁGUA



1. Utilizando o fermentado liofilizado de Bti - PL (1)

Pesou-se o fermentado liofilizado de Bti (1 g) e o excipiente de interesse (1,5 g), os quais foram transferidos para um almofariz de vidro e misturados com uma espátula e em seguida foi adicionado água destilada (20 gotas) e misturou-se com pistilo.

Após essa etapa, essa massa foi passada em tamis 24 e em seguida foi colocada em estufa à temperatura de 35 °C por 60 minutos. Após o tempo de espera, a mistura foi repassada em tamis 60. Pesou-se a massa final.

2. Utilizando a suspensão obtida do fermentador antes da centrifugação e liofilização - fermentado liofilizado de Bti – PL (2)

Separou-se a suspensão contendo Bti (15 mL corresponde a 12 mg de proteína total de Bti), a esse líquido foi adicionado o excipiente de interesse (1 g), a mistura foi feita em almofariz e misturado com auxílio de pistilo. Quando a mistura se tornou uniforme, foi transferida para um vidro-relógio e feita a liofilização. Após essa etapa, a massa foi passada em tamis 60 e em seguida pesada.

4.7. Análises dos comprimidos larvicidas em campo

Em baldes contendo água potável (10 L) (FIGURA 16 (A)), foram colocados copos descartáveis perfurados contendo 25 larvas do mosquito *A. aegypti* (FIGURA 16 (B)).

Foram analisadas as 4 formulações dos comprimidos (TABELA 3 - p.51), sendo estas feitas em triplicatas.

FIGURA 16 - TESTE EM CAMPO COM COMPRIMIDOS LARVICIDAS



Em cada balde foi adicionado um comprimido larvicida. A taxa de mortalidade foi verificada diariamente em um prazo de 72 horas com introdução de novas larvas (n = 25) semanalmente.

Foram monitorados temperatura do ar, pH, condutividade, luminosidade e umidade relativa. Os formulados continham diferentes concentrações do fermentado liofilizado de Bti e excipientes, denominados de I a IV (TABELA 3 - pg.51).

Assim que as larvas morriam, elas eram retiradas e novas larvas vivas foram adicionadas, para se avaliar a persistência da atividade larvicida.

Foram calculados também as Unidades Tóxicas Internacionais por miligramas (UTIs/mg), tendo como produto padrão o Vectobac WDG (lote: 259-387-PG, validade 11/2017) com a aplicação da metodologia preconizada pela OMS (WHO, 2005).

Os baldes foram mantidos em condições que simulam condições de campo com intensidade luminosa e pH controlados.

4.8. Análises de comprimidos larvicidas por Fitotron (câmara de fotoperíodo) - (laboratorial)

Em uma câmara de fotoperíodo (Fitotron) foram colocados 09 tipos de formulações de comprimidos, de massa final de 50 mg, em um béquer contendo 100 mL de água desclorada. Cada teste foi realizado em quadruplicada. O teste no Fitotron durou 45 dias.

Os 09 tipos de formulações foram:

- **Comprimido I** – Fermentado liofilizado de Bti (30%) + Celulose (68%) + Excipiente (2%);
- **Comprimido II** - Fermentado liofilizado de Bti (23%) + HPMC (20%) + Amido (10%) + Celulose (45%) + Excipiente (2%);
- **Comprimido III** – Fermentado liofilizado de Bti (23%) + HPMC (40%) + Amido (10%) + Celulose (25%) + Excipiente (2%);
- **Comprimido IV** – Fermentado liofilizado de Bti (61,4%) + HPMC (9%) + Amido (15,6%) + Celulose (12%) + Excipiente (2%);
- **Comprimido V** – Fermentado liofilizado de Bti (18%) + Amido (82%);
- **Comprimido VI** – Fermentado liofilizado de Bti (23%) + polietilenoglicol (PEG) 1500 (42%) + HPMC (35%);
- **Comprimido VII** – Fermentado liofilizado de Bti (mg) (23%) + HPMC (28,5%) + Manitol (48,5%) + Água destilada (20 gotas);
- **Comprimido VIII** – Fermentado liofilizado de Bti (mg) (23%) + HPMC (15%) + Dióxido de silício (62%);
- **Comprimido IX** – Fermentado liofilizado de Bti (23%) + PEG 6000 (77%).

As condições de temperatura utilizadas no Fitotron estão apresentadas na tabela 4.

TABELA 4 - CONDIÇÕES REFERENTES AO CLIMA VERÃO DO NORDESTE BRASILEIRO COLOCADAS NO FITOTRON

Hora	Temperatura (°C)
6 às 11	20 – 28
11 às 13	28 – 32
13 às 15	32 – 35
15 às 17	35 – 38
17 às 17:30	38 – 35
17:30 às 18	35 – 30
18 às 00	30 – 25
00 às 6	25 – 20

<https://www.climatempo.com.br> › previsao-do-tempo › cidade › bomjesus-pi

Posteriormente foram feitos os testes de bioensaios com larvas de *A. aegypti*, para os 09 comprimidos.

4.9. Determinação da atividade larvicida para o experimento do Fitotron

Foram utilizadas 20 larvas no estágio de 3º instar final e/ou 4º inicial para cada análise de bioensaio.

A determinação da atividade larvicida foi feita para os 9 tipos de formulações de comprimidos expostos ao Fitotron. A concentração de proteína/água variou de $2 \cdot 10^{-1}$ a $2 \cdot 10^{-9}$ mg de proteína / 100 mL de água desclorada.

Para os grupos controle, 20 larvas foram expostas à água desclorada. As análises foram feitas em triplicata.

As mortalidades das larvas foram verificadas a cada 24 horas, no controle e no tratamento até a mortalidade total de todas as larvas de cada tratamento. As larvas incapazes de atingir a superfície da água ou imóveis quando submetidas a estímulos, batidas sucessivas na parede dos copos com pipeta, foram consideradas como larvas mortas. As larvas mortas foram descartadas a cada leitura de 24 horas.

4.10. Determinação da atividade larvícida do pó (PL)

Foram realizados 7 tipos de testes para determinar a atividade larvícida do formulado em pó.

Foram utilizadas larvas de *A. aegypti* no estágio de 3º instar final e/ou 4º inicial para cada análise de bioensaio, sendo estes feitos em triplicatas à temperatura de 25 °C.

1º teste: 15 larvas foram submersas em água desclorada (100 mL) em copos plásticos descartáveis com capacidade para 330 mL, em seguida foi adicionado o pó larvícida – PL (1) (10 mg), descrito no item 4.5, p.52, e verificada a mortalidade das larvas de hora em hora.

2º teste: 15 larvas foram submersas em água desclorada (100 mL) em copos plásticos descartáveis com capacidade para 330 mL, em seguida foi adicionado o pó larvícida feito com a suspensão contendo as proteínas - PL (2) (10 mg), descrito no item 4.5, p. 52, e verificada a mortalidade das larvas por hora.

3º teste: Em um recipiente plástico (40 x 27 cm) foi adicionado água desclorada (3 L), em seguida foram inseridas 15 larvas e o pó larvícida – PL (1) (4 mg). A mortalidade das larvas foi monitorada por hora.

4º teste: Em um béquer com água desclorada (250 mL) foi adicionado o pó larvícida - PL (1) (10 mg). Esse sistema ficou em repouso em bancada de laboratório por 45 dias, exposto a luz e temperatura ambiente (19 – 30 °C). Após esse período, esse sistema foi utilizado para realizar o bioensaio, utilizando 15 larvas. A mortalidade das larvas foi monitorada por hora.

5º teste: 150 larvas foram submersas em água desclorada (100 mL) e expostas ao pó larvícida – PL (1) (10 mg). Após a morte de todas as larvas, as mesmas foram retiradas do copo plástico, lavadas com água desclorada (3 vezes), para assim retirar todo resquício de pó larvícida (PL) que poderia estar agregado à superfície das larvas. Em seguida essas larvas mortas foram colocadas em água desclorada (100 mL) limpa e guardadas em câmara de BOD por 24h. Após as 24 h, as larvas mortas foram substituídas por 25 larvas vivas. A mortalidade das novas larvas foi monitorada por hora.

6º teste: As 150 larvas mortas do teste 5, foram maceradas em gral com pistilo e em seguida foram filtradas em papel de filtro (150 mm), utilizando água desclorada (150 mL). 25 larvas foram expostas ao filtrado. A mortalidade das larvas foi monitorada por hora.

4.11. Determinação da atividade larvícida utilizando o pó larvícida (PL1) para controle do *Culex*

Foram dispostas nove caixas d'água abastecidas com 500 L de água potável. Três réplicas para controle, três para o VectoBac WG® (Lote 291-325-PG30) com 1,5 g/500 L seguindo recomendações de aplicação do fabricante e três para o formulado PL1 em versão pó, com 1 g/500 L (FIGURA 17). Semanalmente as larvas de *Culex* foram coletadas com rede para insetos aquáticos em estação de tratamento de esgoto (ETE) e lagoa de tratamento de efluentes (LTE) da região de Londrina. O número de larvas coletadas foi indeterminado e distribuídas entre as caixas de forma equitativa, colocando-as em balde com 10 L de água e distribuindo um volume igual à cada caixa, distribuindo assim, as larvas de forma aleatória. Um novo lote de larvas foi adicionado ao início de cada semana até a uma diminuição significativa da atividade larvícida.

A análise da mortalidade se deu em relação à diminuição populacional de larvas nas caixas d'água, em que zero horas foi considerado a população inicial, 24, 48 e 72 horas em relação à inicial representam a mortalidade. As larvas foram coletadas com o auxílio de rede para insetos aquáticos, armazenadas em álcool 70% e contabilizadas, excluindo-se as pupas.

O ensaio se estendeu de 18/03/2019 à 03/05/2019.

FIGURA 17 - BIOENSAIO DE PRÉ-CAMPO UTILIZANDO PÓ LARVICIDA PARA CONTROLE DE *Culex*



4.12. Testes ecotoxicológicos

Os testes ecotoxicológicos realizados neste trabalho utilizaram como bioindicadores a *Daphnia magna*, sendo seu cultivo realizado conforme a norma ABNT – NBR 12713/2018, a alga *Scenedesmus subspicatus* através da norma ABNT – NBR 12648/2018 e *Artemia salina* através da metodologia de Meyer, et al 1982.

As amostras analisadas foram: liofilizado de Bti, excipiente de interesse e pó larvicida (PL1).

4.12.1. Teste com *Daphnia magna*

Os testes com *Daphnia magna* foram realizados em triplicatas, em béqueres de 100 mL, utilizando duas quantidades de pó larvicida, do liofilizado de Bti e do excipiente (0,02 e 0,1 mg do formulado / mL de água destilada), incluindo o controle com a água de diluição.

Para esse teste foram expostos 20 organismos neonatos (2 a 26 horas de vida) em cada béquer, por um período de 48 h. Os recipientes de ensaio foram colocados em incubadora com temperatura de 23 °C, coberto com um filme de PVC.

Após o tempo de prova observou-se o número de indivíduos imóveis.

4.12.2. Teste com *Scenedesmus subspicatus*

Os testes com algas do tipo *Scenedesmus subspicatus*, foram realizados em triplicatas, utilizando duas quantidades de pó larvicida, do liofilizado de Bti e do excipiente (0,02 e 0,1 mg do composto / mL de água destilada) incluindo o controle com a água de diluição, por um período de 72 h com temperatura de 23 °C, com iluminação contínua (lâmpada fluorescente) aproximadamente 4 515 lux e com agitação.

O efeito foi determinado pela comparação da reprodução das algas nas diluições-teste em relação a um branco onde não foi adicionada amostra. Esse controle foi feito por fotometria, realizando a leitura na absorbância em 590 nm.

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico em um medidor de pH, previamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,00. Em todas as amostras foram realizadas a leitura do pH antes dos inícios dos testes.

4.12.3. Preparação das suspensões utilizadas nos testes ecotoxicológico com *Daphnia magna* e *Scenedesmus subspicatus*.

Foram feitos 6 tipos de suspensões:

1ª suspensão: Foi adicionado liofilizado de Bti (10 mg) em água destilada (100 mL). Essa mistura ficou em agitação com o auxílio de barra magnética por 72 h. Em seguida essa mistura foi filtrada e com esse filtrado foi realizado o teste toxicológico.

2ª suspensão: Realizou-se procedimento igual a 1ª, modificando apenas o material, ao invés de utilizar o liofilizado de Bti utilizou-se pó larvicida 1 (PL1).

3ª suspensão: Realizou-se procedimento igual a 1ª, modificando apenas o material, ao invés de utilizar o liofilizado de Bti utilizou-se o excipiente de interesse.

4ª suspensão: Foi adicionado liofilizado de Bti (10 mg) em água destilada (100 mL). Essa mistura ficou em agitação com o auxílio de barra magnética por 72 h. Em seguida foi realizado o teste toxicológico (sem filtração).

5ª suspensão: Realizou-se procedimento igual a 4ª, modificando apenas o material, ao invés de utilizar o liofilizado de Bti utilizou-se pó larvicida 1 (PL1).

6ª suspensão: Realizou-se procedimento igual a 4ª, modificando apenas o material, ao invés de utilizar o liofilizado de Bti utilizou-se o excipiente de interesse.

4.12.4. Teste com *Artemia salina*

Serão descritos a seguir a metodologia para eclosão dos ovos da *Artemia Salina* e a do teste ecotoxicológico utilizando este organismo-teste.

4.12.4.1. Eclosão dos ovos de *Artemia salina* e teste ecotoxicológico

Foi utilizada a metodologia de Meyer e colaboradores (1982) adaptada. Preparou-se uma solução salina na concentração de 0,03 g / mL. Colocou-se para eclodir os ovos de *Artemia salina* (200 mg) em solução salina (0,03 g / mL) por 48 horas, com temperatura controlada de 25 °C em câmara BOD (12 h :12 h) (MEYER et al, 1982).

Após a eclosão dos ovos, dez larvas de *Artemia salina* foram transferidas com auxílio de pipeta para frascos de vidro contendo solução salina. As amostras foram testadas em diferentes concentrações (TABELA 5). O teste foi acompanhado de controle negativo para cada substância a ser testada e o ensaio foi realizado em quintuplicada.

TABELA 5 - PARÂMETROS DO BIOENSAIO TOXICOLÓGICO COM *Artemia salina*

Amostras	massa (mg/mL)	Volume final das amostras (solução salina (mL))	Quantidade de <i>Artemia salina</i>
Controle	0	10	10
Liofilizado de Bti	0,1	10	10
Liofilizado de Bti	0,075	10	10
Liofilizado de Bti	0,05	10	10
Liofilizado de Bti	0,025	10	10
Excipiente	0,1	10	10
Excipiente	0,075	10	10
Excipiente	0,05	10	10
Excipiente	0,025	10	10
Formulado larvicida	0,1	10	10
Formulado larvicida	0,075	10	10
Formulado larvicida	0,05	10	10
Formulado larvicida	0,025	10	10

Por se tratar de um crustáceo ativo em água salina, a falta de movimento e sedimentação são os indicadores de morte da artemia.

A contagem das artemias mortas e vivas foi realizada após 24 h.

4.13. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A análise morfológica das larvas de *A. aegypti* e do liofilizado de Bti foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura - MEV TESCAN VEGA3 LMU no Centro de Microscopia da UFPR. As amostras foram depositadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro antes da análise.

4.13.1. Ponto Crítico - MEV

A análise do ponto crítico para visualização das larvas de *A. aegypti* foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura - MEV TESCAN VEGA3 LMU. As amostras primeiramente foram congeladas até o dia da análise. Para essa análise as larvas foram desidratadas, para isso foram mergulhadas durante 10 min em uma sequência de solução de etanol (%): 50, 60, 70, 80, 90, 100.

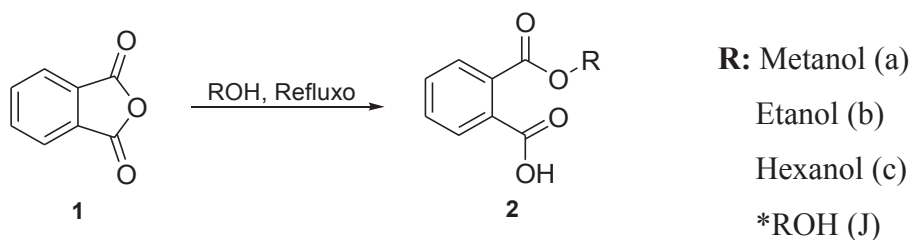
Para se fazer o ponto crítico, levou-se a amostra já fixada e completamente desidratada, à câmara de CPD (em inglês CPD - Critical Point Dryer), em um pequeno volume de etanol (100 %). Com a câmara isolada injetou-se CO₂ líquido, fazendo-se várias substituições até remoção total do etanol. Posteriormente ocorreu o aquecimento controlado da câmara, tornando o CO₂ gasoso a uma determinada pressão sem que exista a modificação na estrutura do material biológico.

Em seguida as amostras foram depositadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro antes da análise no MEV.

4.14. Síntese de novos repelentes derivados do anidrido ftálico

Síntese do ácido 2-(alcoxycarbonil)-benzoico (ESQUEMA 1)

ESQUEMA 1 – SÍNTESE PARA OBTENÇÃO DO ÁCIDO 2-(ALCOXICARBONIL)BENZOICO



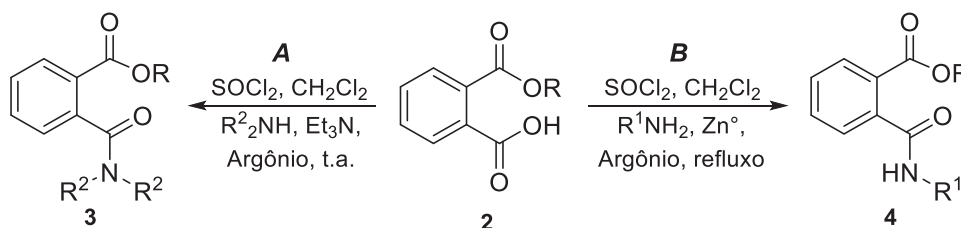
*ROH (J) – sigla para o solvente usado que está sob sigilo.

Em um balão de 50 mL foi adicionado anidrido ftálico **1** (1,48 g, 10 mmol) e o álcool anidro (10 mL), a reação foi mantida em refluxo por 2-24 h (ESQUEMA 1). Quando foram usados álcoois lipofílicos foi necessária adição catalítica de ácido fosfórico. A reação foi acompanhada por CCD e finalizada com a retirada do álcool em excesso por destilação à pressão reduzida em um rota-evaporador (WAKABAYASHI *et al.*, 2008).

O produto **2a** foi obtido com 86% em rendimento; **2b** (80%); **2c** (93%) e **2J** (88%).

Síntese de 2-(dialquilcarbamoil) benzoato de alquila (ESQUEMA 2).

ESQUEMA 2 – SÍNTESE PARA OBTENÇÃO DE 2-(DIALQUILCARBAMOIL)BENZOATO DE ALQUILA



R²NH:

Pirrolidina

Piperidina

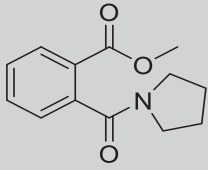
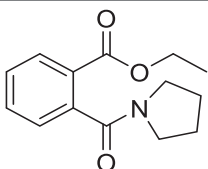
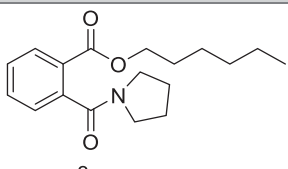
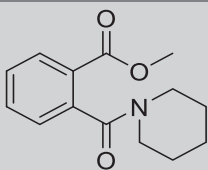
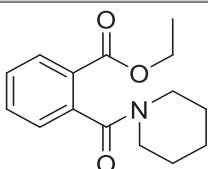
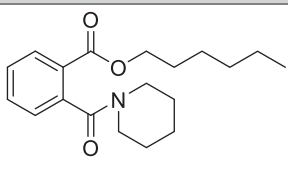
R¹NH:

n-butilamina

Método A: Em um balão de 50 mL, de duas bocas, foi colocado o material de partida (**2a/2b/2c e 2J**) (6 mmol) sob atmosfera inerte de argônio, seguida da adição de diclorometano anidro (20 mL) e da amina secundária (6 mmol), trietilamina (1,81 g; 18 mmol) e por fim foi adicionado gota a gota o cloreto de tionila (0,71 g; 6 mmol). A reação permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por aproximadamente 5 h. Finalizou-se a reação com a adição de água destilada (10 mL). A mistura reacional foi transferida para funil de separação e a fase aquosa foi extraída com diclorometano (2 x 20 mL). Juntou-se as fases orgânicas e lavou-se a fase orgânica com solução de HCl (1N) (4 x 10 mL) e por fim com solução de NaOH (1N) (2 x 10 mL). A fase orgânica foi secada com MgSO₄ anidro, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Os produtos **3a/3b/3J1/3c/3d/3e/3J2 e 3f** foram purificados por cromatografia em coluna usando sílica gel como fase estacionária e como eluente uma mistura com proporções variadas de hexano e acetato de etila (20 – 50% de hexano) (HONMA *et al.*, 2001).

Os rendimentos dos produtos **3a/3b/3J1/3c/3d/3e/3J2 e 3f** estão demonstrados na tabela 6.

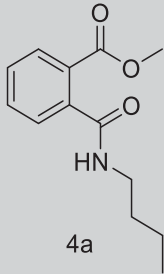
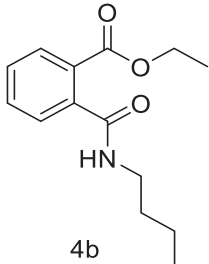
TABELA 6 - RENDIMENTOS DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS PELO MÉTODO A

Substância	Rendimento (%)
 3a	80
 3b	96
Derivado 3J1	88
 3c	82
 3d	84
 3e	90
Derivado 3J2	92
 3f	83

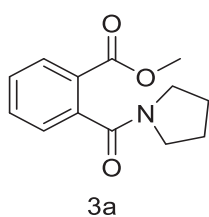
Método B: Em um balão de 50 mL, de duas bocas, acoplado com condensador de refluxo foi colocado o material de partida (**2a/2b/2c e 2J**) (4 mmol) sob atmosfera inerte de argônio. Em seguida, foi adicionado diclorometano anidro (10 mL) e em seguida foi adicionado gota a gota o cloreto de tionila (0,27 g; 2,3 mmol). Deixou-se a reação sob refluxo por 45 min. Após, adicionou-se uma mistura da amina primária (4 mmol) com Zn° em pó (0,3 g) e deixou-se sob refluxo por 12 h. Finalizou-se a reação com adição de

solução saturada de NaHCO_3 (10 mL), separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etila (4 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secadas com MgSO_4 anidro, filtrada e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Os produtos **4a/4b** e **4J3** foram purificados por cromatografia em coluna usando sílica gel e como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila (1:1). Os rendimentos dos produtos **4a/4b** e **4J3** estão demonstrados na tabela 7.

TABELA 7 - RENDIMENTOS DAS SUBSTÂNCIAS SINTETIZADAS PELO MÉTODO B

Substância	Rendimento (%)
 4a	53
 4b	60
Derivado 4J3	68

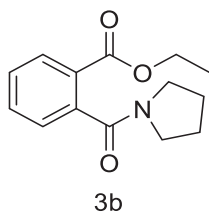
A seguir os dados espectrais dos compostos candidatos à repelentes sintetizados através do método A e B.



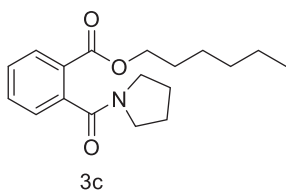
2-(pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de metila:

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,02 (dd, $J = 7,5, 1,1$ Hz, 1H); 7,58 (td, $J = 7,5, 1,4$ Hz, 1H); 7,44 (td, $J = 7,7, 1,4$ Hz, 1H); 7,33 (dd, $J = 7,2, 1,1$ Hz, 1H); 3,89 (s, 1H); 3,69 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H); 3,11 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H); 2,06 – 1,79 (m, 4H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,36; 166,26; 139,99; 132,93; 130,48; 128,63; 126,88; 77,10; 52,42; 48,38; 45,55; 25,90; 24,63.

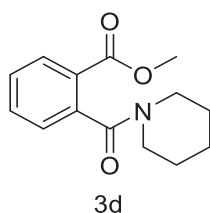
2-(pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de etila:

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,03 (dd, $J = 7,8$, 1,3 Hz, 1H); 7,57 (td, $J = 7,5$, 1,4 Hz, 1H); 7,44 (td, $J = 7,6$, 1,4 Hz, 1H); 7,32 (dd, $J = 7,4$, 1,4 Hz, 1H); 4,34 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,68 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 3,12 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H); 2,03 – 1,79 (m, 4H); 1,36 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).
 RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,36; 165,88; 139,80; 132,79; 130,54; 128,62; 127,22; 126,88; 61,32; 48,38; 45,51; 25,9; 24,62; 14,22.

2-(pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de hexila:

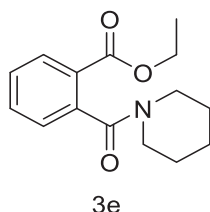
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,02 (dd, $J = 7,3$, 1,4 Hz, 1H); 7,57 (td, $J = 7,5$, 1,4 Hz, 1H); 7,44 (td, $J = 7,6$, 1,5 Hz, 1H); 7,33 (dd, $J = 7,6$, 1,7 Hz, 1H); 4,28 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 3,68 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 3,12 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H); 2,07 – 1,82 (m, 4H); 1,81 – 1,64 (m, 2H); 1,50 – 1,20 (m, 6H); 0,90 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,35; 165,92; 139,84; 132,78; 130,51; 128,61; 127,23; 126,91; 77,11; 65,59; 48,37; 45, 51;

2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de metila:

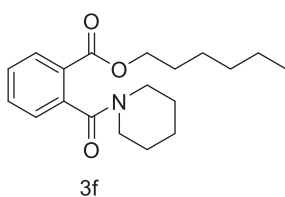
RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,03 (dd, $J = 7,8$, 1,4 Hz, 1H); 7,57 (td, $J = 7,5$, 1,4 Hz, 1H); 7,43 (td, $J = 7,6$, 1,5 Hz, 1H); 7,28 (dd, $J = 5,8$, 1,6 Hz, 1H); 3,89 (s, 3H); 3,84 – 3,65 (m, 2H); 3,12 (t, $J = 5,5$ Hz, 2H); 1,75 – 1,38 (m, 6H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,44; 166,17; 139,20; 132,78; 130,61; 128,49; 127,29; 126,78; 77,06; 52,32; 47,97; 42,47; 25,78; 25,35; 24,61.

2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de etila:

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,03 (dd, $J = 7,9$, 1,7 Hz, 1H); 7,56 (td, $J = 7,5$, 1,5 Hz, 1H); 7,43 (td, $J = 7,6$, 1,5 Hz, 1H); 7,28 (dd, $J = 7,3$, 1,5 Hz, 1H); 4,35 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 4,20 – 3,33 (m, 2H); 3,29 – 2,98 (m, 2H); 1,90 – 1,42 (m, 6H); 1,37 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

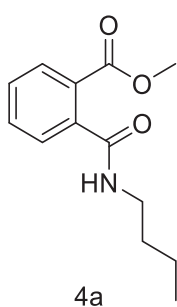
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,51; 165,72; 139,10; 132,65; 130,57; 128,45; 127,65; 126,74; 61,30; 47,94; 42,40; 25,78; 25,31; 24,59; 14,27.



2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de hexila:

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,03 (dd, $J = 7,7, 1,5$ Hz, 1H); 7,56 (td, $J = 7,5, 1,4$ Hz, 1H); 7,43 (td, $J = 7,6, 1,5$ Hz, 1H); 7,28 (dd, $J = 7,5, 1,4$ Hz, 1H); 4,28 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H); 4,04 – 3,31 (m, 2H); 3,26 – 3,00 (m, 2H); 1,86 – 1,21 (m, 14H); 0,90 (t, $J = 6,4$ Hz, 3H).

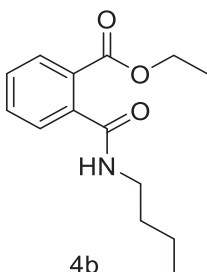
RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,49; 165,76; 139,15; 132,63; 130,54; 128,45; 127,66; 126,77; 77,06; 65,56; 47,94; 42,42; 31,47; 28,64; 25,79; 25,65; 25,33; 24,62; 22,56; 14,02.



2-(butilcarbamoil)-benzoato de metila:

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,81 – 7,69 (m, 1H); 7,48 – 7,28 (m, 3H); 6,58 (s, 1H); 3,80 (s, $J = 6,9$ Hz, 3H); 3,39 – 3,21 (m, 2H); 1,62 – 1,19 (m, 4H); 0,92 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168,96; 167,02; 138,12; 134,32; 131,39; 129,49; 128,98; 127,27; 51,98; 39,48; 31,12; 19,78; 13,44.



2-(butilcarbamoil)-benzoato de etila:

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,85-7,90 (m, 1H); 7,41-7,56 (m, 3H); 5,89 (s, 1H); 4,35 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H); 3,44 (dd, $J = 12,9$ e 7,1 Hz, 2H); 1,43-1,68 (m, 4H); 1,36 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H); 0,96 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 169,3; 166,8; 138,6; 131,7; 130,0; 129,4; 127,6; 61,5; 39,9; 31,5; 20,1; 14,1; 13,7.

4.15. Teste de repelência

Os testes de repelência foram realizados na sala de criação do insetário do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, situado no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, à temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 60 a 70%. Os dados de temperatura e umidade relativa, dentro da sala de criação e gaiola, foram monitorados e registrados utilizando um termo higrômetro digital durante os experimentos.

Para a realização dos testes foram utilizadas gaiolas de madeira com telas nas laterais e vidro na face superior medindo 30 cm x 30 cm, contendo 20 fêmeas do mosquito *A. aegypti*, todas copuladas e ávidas por sangue. Os testes foram realizados no período diurno, respeitando a preferência para a atividade de hematofagia do mosquito, registrando a data e horário de realização dos testes.

Os testes foram realizados de forma similar às normas publicadas pelo *World Health Organization* em 2009, intitulada “*Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin*” (WHO, 2009). Nenhum mosquito foi a óbito durante os testes. Foram testados 11 compostos candidatos a repelentes, previamente sintetizados.

Para os testes, uma das mãos do analisador foi higienizada com sabão neutro e em seguida a face superior, inferior, lateral e a região entre os dedos, foi tratada com a solução etanólica contendo o composto sintetizado. A mão fechada foi introduzida na gaiola para realização dos testes conforme a figura 18, com o analisador sentado, ou seja, em posição de descanso, não tendo realizado esforço físico anteriormente à realização dos testes.

FIGURA 18 - POSICIONAMENTO DA MÃO NA GAIOLA DURANTE A REALIZAÇÃO DOS TESTES DE REPELÊNCIA



Para o teste, foi preparada uma solução etanólica de 85 μL do composto + 425 μL de etanol. Espalhou-se pela mão e esperou-se o etanol evaporar (30 minutos) antes de colocar a mão na gaiola. Após 30 minutos, a mão tratada com o repelente foi inserida na gaiola apropriada e exposta por 3 minutos. Este procedimento foi repetido em intervalos de 30 minutos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Confeção e análises de comprimidos larvicidas em campo

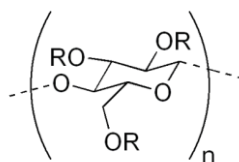
Os comprimidos larvicidas foram confeccionados a partir do liofilizado contendo as proteínas de Bti recebido da Universidade Estadual de Londrina - UEL. A variação na composição dos comprimidos se deu, principalmente, pelo uso de excipientes que poderiam modular a liberação mais rápida ou mais lenta das proteínas, tendo em vista que está descrito em literatura a fotolabilidade das proteínas do Bti (NAVON, 2000; Araújo, *et al* 2007; GALZER, 2016). A composição e a pressão empregada na confecção dos vários comprimidos foram estudadas afim de se obter comprimidos com grau de dureza adequados e que pudessem se desfazer quando colocados em contato com a água, liberando as proteínas.

Em algumas formulações foi utilizado a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), pois propicia a liberação lenta das proteínas (SIEPMANN, J; PEPPAS, N. A, 2012) e o seu uso com os demais excipientes pode melhorar ainda mais a estabilidade das proteínas do Bti em situações adversas.

O excipiente em questão, HPMC (FIGURA 19), é um excipiente hidrofílico derivado da celulose, que foi empregado visando retardar a liberação da proteína e desta maneira proporcionar maior tempo de ação do comprimido em campo.

O substituinte R representa um grupo $-CH_3$, ou um grupo $-CH_2CH(CH_3)OH$, ou um átomo de hidrogênio. As propriedades físico-químicas deste polímero são fortemente afetadas por: (I) o conteúdo do grupo metoxi; (II) o teor do grupo hidroxipropoxi; e (III) a massa molecular.

FIGURA 19 - ESTRUTURA QUÍMICA DA HIDROXIPROPILMETILCELULOSE (HPMC)



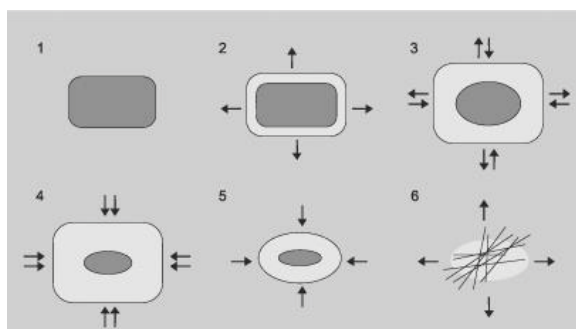
Uma das características mais importantes deste polímero hidrofílico, no que se refere à sua aplicação em sistemas de liberação modificada, é a capacidade de

intumescimento/relaxamento, o qual exerce efeito pronunciado na cinética de liberação das proteínas incorporadas.

O seu uso deve-se, também, a outras características, como a natureza não tóxica e não iônica do polímero (não apresentando problemas de compatibilidade com as proteínas em questão), a rapidez e a economia da tecnologia associada à sua preparação e à possibilidade de fabricação de comprimidos matriciais por compressão direta pois apresenta boas características de compressão sem necessidade de etapa prévia de granulação (WAN, 1991; FELY, 1988).

A liberação das proteínas utilizando o excipiente HPMC pode funcionar de duas formas: 1ª) Depois do polímero formar uma camada em gel em volta da matriz, em tempos são criados canais nessa camada gelatinosa, fazendo com que a água ultrapasse por meio deles, e penetre na matriz, liberando-as lentamente; 2ª) os sistemas matriciais hidrofílicos (gelatinosos) intumescem e sofrem erosão, ou seja, as interações entre a água e o polímero aumentam com consequente redução das interações polímero - polímero, logo as cadeias poliméricas começam a se separar, alargando os espaços onde a difusão das proteínas ocorre. Nesta fase, a taxa de hidratação diminui relativamente à taxa de erosão. As cadeias poliméricas dispersam-se na camada mais externa, resultando em aumento da taxa de erosão (COLOMBO *et al.*, 2000) (FIGURA 20).

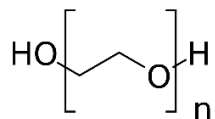
FIGURA 20 - DEMOSTRAÇÃO DE COMO OCORRE A LIBERAÇÃO LENTA DAS PROTEÍNAS COM O USO DO HPMC



1) MATRIZ (PROTEÍNA) NO ESTADO SECO; 2) INÍCIO DA HIDRATAÇÃO E DO INTUMESCIMENTO DO HPMC; 3) E 4) AUMENTO DA HIDRATAÇÃO E INTUMESCIMENTO DO HPMC, DIMINUIÇÃO DA MATRIZ (PROTEÍNAS) E INÍCIO DA EROÇÃO DAS CADEIAS POLIMÉRICAS; 5) AUMENTO DA EROÇÃO DAS CADEIAS POLIMÉRICAS; 6) SEPARAÇÃO DAS CADEIAS POLIMÉRICAS (TRAÇOS) COM A LIBERAÇÃO COMPLETA DA MATRIZ (LOPES, 2005).

O uso do polietilenoglicol - PEG 1500 e 6000 (FIGURA 21) também foi utilizado para prolongamento da liberação da matriz.

FIGURA 21 – ESTRUTURA DO POLIETILENOGLICOL (PEG)



O amido de milho, celulose e o manitol serviram como diluentes para aumentar o volume do pó (para fazer o comprimido) e facilitar a compressão direta.

O amido e a celulose também são usados como aglutinantes, a fim de facilitar a compressão, permitindo a formação dos comprimidos e por serem miscíveis com água. Outra função do amido e da celulose é que atuam também como desagregante, promovendo a ruptura do comprimido, após contato com a água (FERRAZ, 2017). Os comprimidos foram confeccionados variando-se a quantidade do material liofilizado contendo as proteínas bem como os excipientes. Nos primeiros comprimidos foram empregados HPMC, pois na literatura constava a informação de que as proteínas produzidas pelo Bti eram fotolábeis.

5.2. Teste de fotolabilidade das proteínas de Bti frente à Luz UVA e UVB

Ocorreu mortalidade (100%) das larvas de *A. aegypti* após 24 h, para todas as exposições (1, 5, 10, 30 e 60 min) à luz UVA e UVB para os dois tipos de sistemas preparados. Mediante o resultado é possível afirmar que as proteínas de Bti não se decompuseram quando expostas à luz UVA e UVB, ou seja, elas não se mostraram fotolábeis nas condições estudadas.

5.3. Teste de viabilidade dos endosporos de Bti frente à Luz UVA e UVB

Ocorreu o crescimento dos endosporos para as diluições (10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8}) nos tempos de exposição à luz UVA e UVB (1, 5, 10, 30 e 60 min), demonstrando desta maneira que os endosporos do Bti são resistentes nesta faixa de tempo, a esse tipo

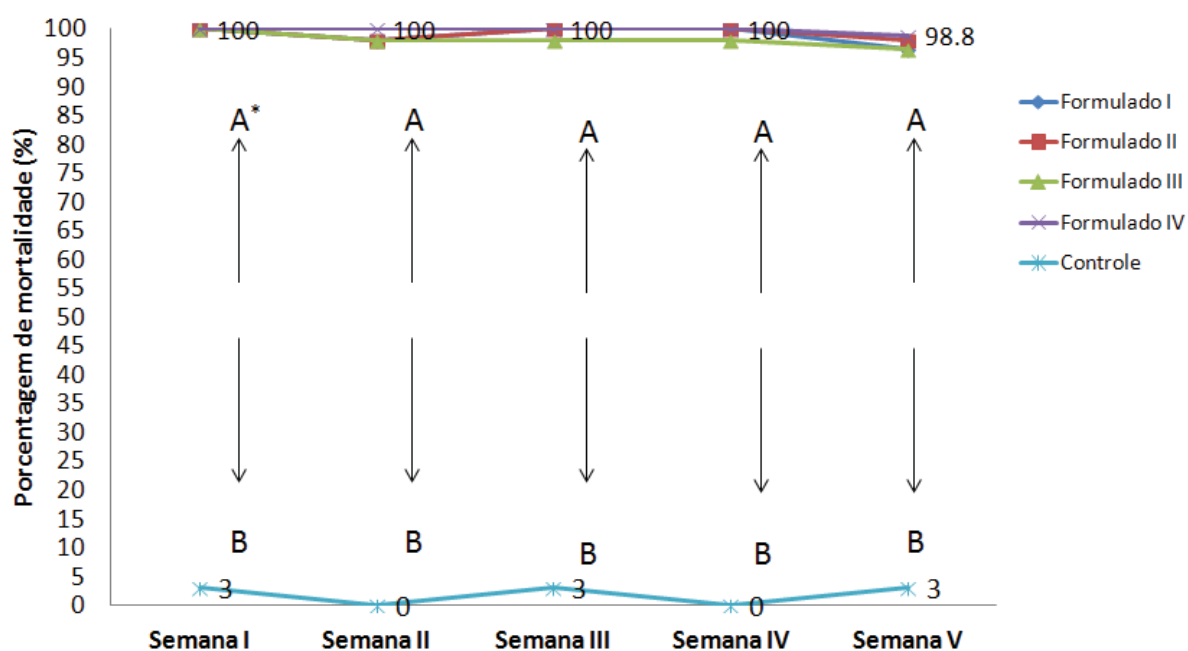
de exposição, o que permite o aumento no número de bactérias capazes de produzirem mais proteínas no meio ambiente.

5.4. Bioensaios para determinação da atividade larvica dos comprimidos em campo

Após determinadas as melhores condições da composição e compressão dos comprimidos, vários bioensaios foram realizados.

Foram utilizadas 25 larvas de *A. aegypti* no 3º instar final e 4º instar inicial em cada balde com 10 L de água potável com adição de um comprimido larvica de 50 mg. Os resultados estão expostos na figura 22.

FIGURA 22 - MORTALIDADE DE LARVAS DE *A. aegypti* EXPOSTAS A DIFERENTES FORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis israelensis* – Bti EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO



* Letras iguais na horizontal em semanas diferentes não diferem entre si pelo teste de Friedman ($F = 7,84$; $p = 0,098$). Letras iguais na vertical e mesma semana não diferem entre si pelo teste de Friedman ($F = 4,0$; $p = 0,045$).

O volume de água manteve-se igual até a 4ª semana. Na quinta semana foram adicionados mais 40 L de água aos baldes, totalizando 50 L, no intuito de ainda avaliar a toxicidade dos comprimidos frente as larvas nesse maior volume, já que o experimento iria ser finalizado uma vez que observou-se o crescimento de microrganismos nos baldes, provavelmente fungos, o que poderia influenciar nos resultados.

De acordo com a figura 22, pôde-se notar que durante as 4 semanas a mortalidade das larvas foi de quase 100% para todos os formulados, no tempo máximo de 72 horas, que é o tempo de fechamento do ciclo das larvas do *A. aegypti*. Na 5ª semana, embora o volume de água tenha sido aumentado de 10 para 50 L, a mortalidade se manteve alta, acima de 98,8%, ou seja, ainda controlando as larvas depois de 5 semanas exposta à luz solar e com 50 L de água para um comprimido de 50 mg.

A análise do bioensaio em campo durou 5 semanas devido ao aparecimento de algas nos baldes, logo, o experimento teve que ser interrompido, já que não se saberia se a mortalidade das larvas aconteceria pela toxicidade das algas na água ou pela toxicidade dos formulados, assim como, se o experimento continuasse poderia ocorrer um falso-positivo, já que a iluminação solar estava sendo bloqueada pelas algas ali existentes, deste modo as condições ambientais seriam alteradas e não se poderia comparar com as condições do experimento realizado nas primeiras semanas. As condições ambientais do ensaio estão expostas na tabela 8.

TABELA 8 - FATORES ABIÓTICOS DURANTE O BIOENSAIO EM CAMPO DOS QUATRO FORMULADOS DE Bti SOBRE *A. aegypti*

Temperatura ambiente média	Umidade relativa média	Lux médio	pH médio	Condutividade
24,7 °C (21,6 – 25,9)	70,2% (39-95)	7854,015 (97-966600)	6,98 (6,4 – 7,39)	181,43 µS cm ⁻¹ (171,00 – 190,00)

Outros fatores também foram verificados, como as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ e a UTI/mg (TABELA 9). Estes foram determinados para o formulado que mostrou melhor resultado para mortalidade de larvas, no caso, o formulado IV, já que no prazo de 24 horas e 48 horas, matava mais rapidamente as larvas que os demais e este formulado IV foi comparado com o melhor comprimido larvicida a venda no mercado, o WDG (larvicida em forma de granulado que tem como base o Bti), comercializado pela Valent BioSciences.

TABELA 9 - CONCENTRAÇÃO LETAL DO FORMULADO IV SOBRE *A. aegypti* E VALORES DE UTI/mg COMPARADOS COM WDG: (LOTE: 259-387-PG, VALIDADE 11/2017)

Concentração Letal	WDG	Formulado IV
CL ₅₀	0,018 a (0,015 – 0,021)	0,02 a (0,017 – 0,024)
CL ₉₀	0,036 a (0,03 – 0,050)	0,041 a (0,033 – 0,055)
UTI/mg	3.000	2.700

É possível verificar que a concentração letal tanto para CL₅₀ e CL₉₀ do formulado IV é similar à do comprimido WDG o que torna o comprimido produzido em nosso grupo bastante promissor para ser usado em programas de controle populacional de *A. aegypti*.

Tendo em vista os ótimos resultados obtidos nos testes larvicida em campo das formulações dos comprimidos preparados, resolveu-se então avaliar a estabilidade das proteínas do Bti, que são descritas como fotolábeis na literatura (BELTRÃO, 2016; NAVON, 2000), em equipamento que pudesse reproduzir as condições de intensidade luminosa e temperatura de campo mais severas.

5.5. Análises dos comprimidos larvicidas verificando a estabilidade das proteínas do Bti utilizando Fitotron

A linha de câmara climática com fotoperíodo (Fitotron) possui controle preciso da temperatura, umidade relativa e radiação (fonte de luz), permitindo diferentes tipos de estudos, dependendo do tipo de luz utilizada.

Neste caso, foi escolhido trabalhar com o Fitotron (FIGURA 23), pois esta câmara pode simular condições climáticas de diferentes tipos de regiões. Desta maneira a condição escolhida foi referente ao clima da região nordeste (intervalo de temperatura entre 19 °C – 38 °C) pois são as condições climáticas mais severas do país.

FIGURA 23 - CÂMARA DE FITOTRON UTILIZADA NO EXPERIMENTO



Os quatro formulados a base de proteínas de Bti preparados foram submetidos ao estudo na câmara climática para que se pudesse avaliar o tempo em que esses comprimidos iriam, eventualmente, perder a atividade.

Pôde-se verificar a estabilidade das proteínas do Bti nas várias formulações de comprimidos, utilizando esta câmara.

O teste em Fitotron durou 45 dias, e as proteínas se mantiveram estáveis por todo este período, sendo isto verificado por análises realizadas semanalmente para verificar a existência e a estabilidade das proteínas pelo método do biureto.

Como foi possível a visualização da presença da banda característica de proteína em 540 nm, pôde-se confirmar a presença das proteínas no meio e, para confirmação deste resultado também foram realizados em paralelo bioensaios com larvas de *A. aegypti*. A mortalidade de 100% das larvas confirmou a presença de proteínas de Bti corroborando com os resultados visualizados em Uv-vis.

Após os 45 dias de testes no Fitotron, foram realizados novamente os testes de bioensaios com as larvas para todas as formulações.

5.6. Bioensaios para determinação da atividade larvicida utilizando os comprimidos expostos ao Fitotron

Após os 45 dias de teste usando o Fitotron, foram avaliadas as atividades larvicidas para todas as formulações.

Foram utilizadas 20 larvas de 3º e 4º instar nos testes bioensaios.

Ocorreu morte das larvas na concentração até de 2×10^{-9} mg de proteína/100 mL de água, o que denota, ao contrário do que está descrito em literatura (NAVON, 2000; Araújo, *et al* 2007; GALZER, 2016) que essas proteínas não são fotolábeis e/ou ao se

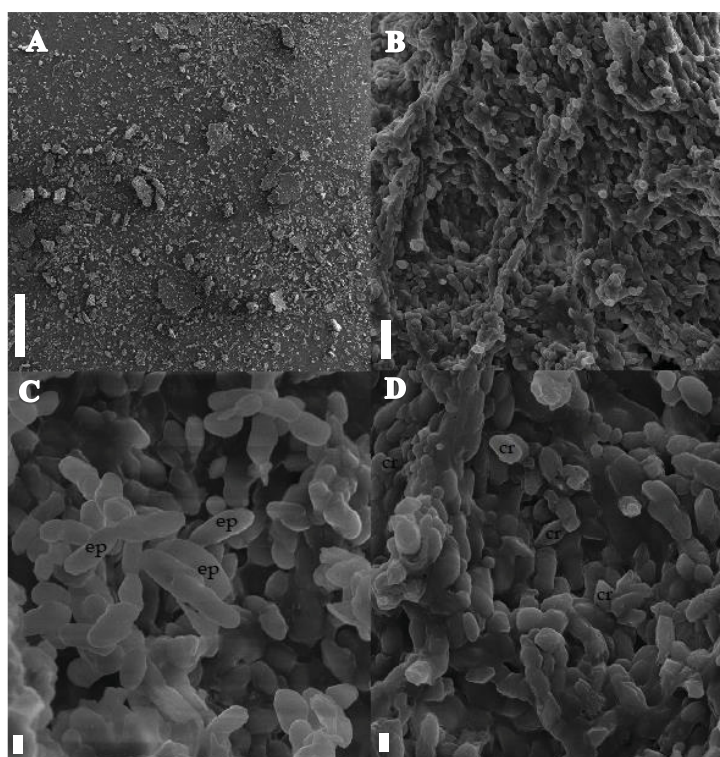
decomporem, produzem sub-unidades capazes de manter a atividade larvica, também os endósporos podem germinar mais proteínas dependendo das condições ambientais expostos.

Depois da realização destes testes, a fase aquosa contendo o conteúdo dos comprimidos estudados via Fitotron foram armazenadas em laboratório em temperatura ambiente (19 – 25 °C) sob abrigo de luz. Após um ano de armazenamento as soluções foram novamente submetidas a bioensaios com larvas de *A. aegypti* e a mortalidade das larvas (100%) ocorreu em 24 horas, confirmando a estabilidade do produto nestas condições.

5.7. Caracterização morfológica do fermentado liofilizado de Bti por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica, por meio de MEV mostrou que o liofilizado de Bti possui cristais bipiramidais, cuboideis e esféricos (FIGURA 24 (C) e (D)).

FIGURA 24 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO LIOFILIZADO RECEBIDO DA UEL - CRISTAIS DE BTI (A) E (B) MATERIAL LIOFILIZADO DE BTI (C) ENDOSPOROS (D) CRISTAIS



LEGENDA: * BARRA ESCALA – (A) 1 mm (B) 10 µm (C) e (D) 5µm

Essas formas vistas mediante a lente microscópica podem fornecer indicações sobre a atividade inseticida dos cristais de uma estirpe (TAYLOR *et al.*, 1992). Cristais bipiramidais podem estar associados às proteínas do tipo Cry1, os cristais cuboides podem estar associados com as proteínas do tipo Cry2, e a forma esférica é típica das proteínas Cry4 (FIGURA 24 (D)), e os endosporos em forma de bastão (FIGURA 24 (C)), como esperado, já que não mudam de formato independente da estirpe.

5.8. Desenvolvimento de nova formulação larvicida e bioensaios para determinação da atividade larvicida

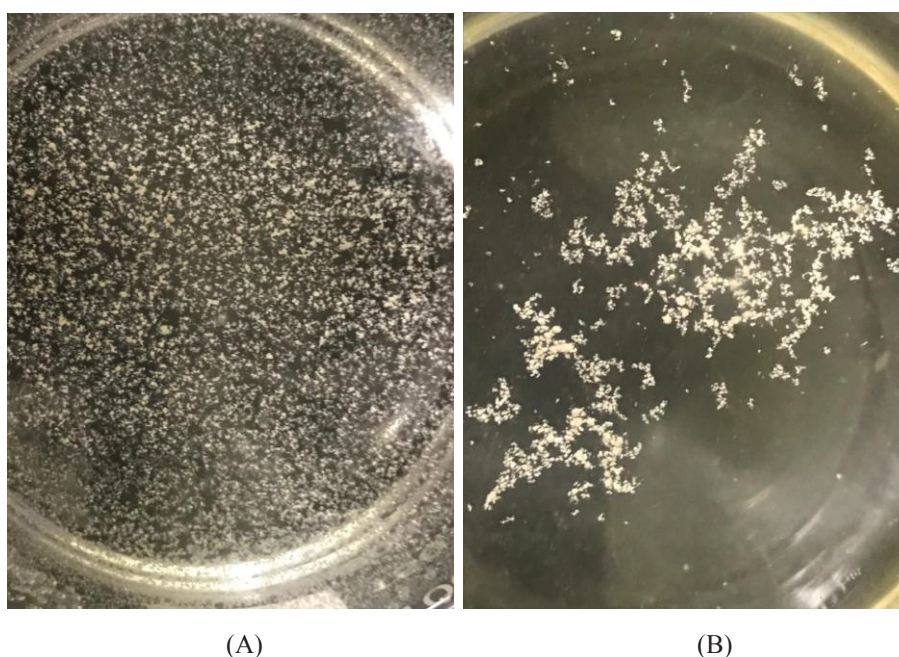
Os resultados dos estudos realizados com os comprimidos preparados nos indicaram que as proteínas do Bti não são fotolábeis como descrito em literatura (NAVON, 2000; Araújo, *et al* 2007; GALZER, 2016). Provavelmente a perda da atividade dos formulados usando proteínas de Bti não estaria, portanto, vinculada à degradação das proteínas, mas, provavelmente, devido ao fato de as proteínas, com o tempo, não permanecerem na superfície da água onde se encontram as larvas dos mosquitos. Essa hipótese, levantada a partir dos resultados obtidos com os comprimidos larvicidas, nos indicou a necessidade de adequar à formulação das proteínas à necessidade de mantê-las na superfície da água. Ressalta-se que não existe à nível mundial nenhum produto comercial com ação larvicida, à base de proteínas de Bti, que possibilite que as proteínas permaneçam na superfície da água por um longo período de tempo. Tal formulação seria de grande interesse uma vez que mosquitos do gênero *Culex* e *Anopheles*, por exemplo, costumam se proliferar em grandes volumes de água e tal formulação poderia ser aplicada para o controle de mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*.

Várias estratégias foram testadas, sem sucesso, com o objetivo de manter as proteínas na superfície da água, visando obter um formulado com atividade larvicida que pudesse ser empregado em grandes superfícies de água, ao contrário do que acontece com os comprimidos que poderiam ser usados para controlar as larvas em pequenos volumes de água. Uma das estratégias empregada foi concebida a possibilidade de se empregar uma substância que apresentasse alta afinidade pelas proteínas do Bti e baixa afinidade pela água bem como densidade inferior à da água. Após vários testes variando-se a natureza de possíveis excipientes e a proporção entre o liofilizado contendo as proteínas de Bti e o excipiente, conseguiu-se desenvolver uma formulação em pó que apresentou

as características desejadas: fluviabilidade do pó em água, capacidade em se dispersar pela superfície da água e pequeno tamanho dos grânulos formados (FIGURA 25 (A)).

A fluviabilidade é importante pois, como as larvas ficam subindo e descendo para a superfície em torno de 15 cm de profundidade, se caso as proteínas afundassem não entrariam em contatos com as larvas, logo não ocorreria letalidade das mesmas. A capacidade de se dispersar se torna necessário para que assim consiga alcançar o maior espaço possível e assim provocar a morte de maior número de larvas e também os grânulos não podem ficar aglomerados como mostra a figura 25 B pois se caso isso acontece, o peso molecular do pó agregados aumentariam e afundariam, não entrando em contato desta maneira com as larvas. E por fim os grânulos tem que ser pequeno para o peso molecular deles não sejam altos afim de não precipitar.

FIGURA 25 - DIFERENTES TIPOS DE FORMULAÇÕES DO PÓ LARVICIDA: (A) PL1 COM AS CARACTERÍSTICAS DESEJADAS E (B) PÓ LARVICIDA COM GRÂNULOS MAIS AGREGADOS UM AO OUTRO.

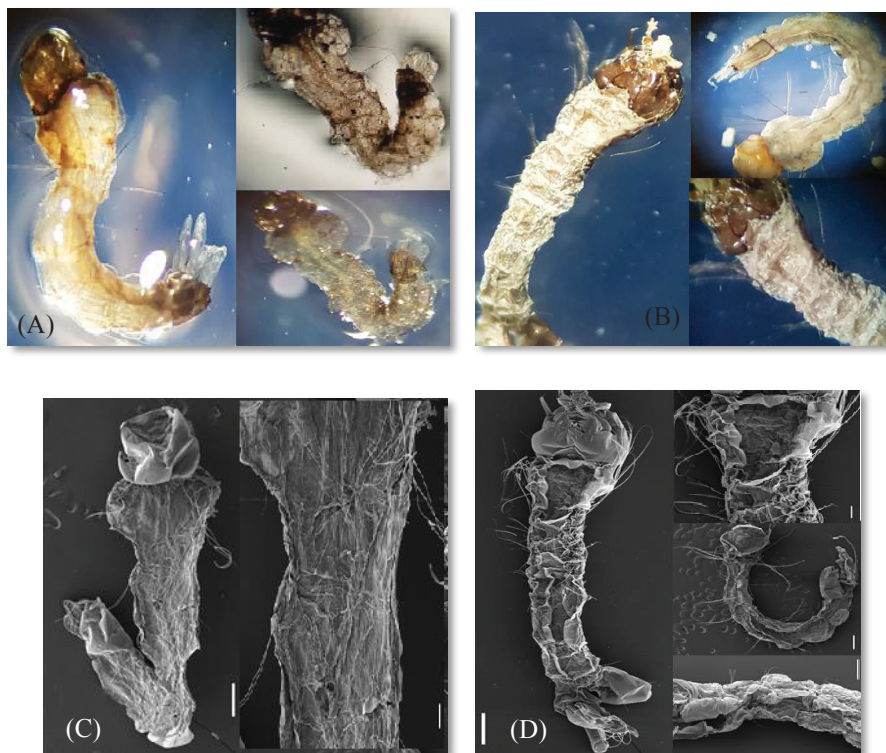


Os bioensaios foram efetuados com a formulação preparada para avaliar a eficiência da mesma. No teste 1 (item 4.10., p.56), foi utilizado 10 mg do PL1 em 100 mL de água desclorada e foi constatada a morte das larvas de *A. aegypti* (100%) após 3 h de exposição ao pó larvicida (FIGURA 26).

Na figura 26 (A) e (C) é possível perceber que ao acontecer a morte da larva sem tratamento larvicida (morte por falta de alimento), o corpo da larva fica intacto, sem qualquer lesão, já na figura 26 (B) na morte ocasionada pelo formulado larvicida, nota-

se o pó agregado a toda superfície do corpo da larva e na figura 26 (D), observa-se que a larva tratada com o pó contendo as proteínas do Bti apresenta um rompimento do tórax à cauda.

FIGURA 26 - (A) E (C) LARVAS MORTAS POR FALTA DE ALIMENTO (B) E (D) LARVAS MORTAS COM TRATAMENTO LARVICIDA



(A) E (B) – ESTEREOMICROSCÓPIO BEL PHOTONICS STM PRO.

(C) E (D) – MICROSCOPIA DE VARREDURA ELETRÔNICA; BARRA ESCALA - 1 μ m

Já para o teste 2 (item 4.10., p.56, em que se usou a suspensão obtida do fermentador antes da centrifugação e liofilização, para a confecção do formulado com atividade larvicida - PL2, as larvas morreram (100%) em 24 h. Essa diferença de tempo é explicada pelo fato do líquido possuir menor quantidade de proteína (0,12 mg de proteína em 10 mg de fermentado liofilizado de Bti - PL (2)) ao se comparar com o fermentado liofilizado - PL (1) (0,23 mg de proteína em 10 mg de fermentado liofilizado de Bti). Esse teste foi realizado no intuito de verificar a possibilidade de se utilizar a suspensão obtida do fermentador antes da centrifugação e liofilização, o que simplificaria o processo de produção do larvicida, sendo que o teste revelou que apesar da mortalidade ser mais lenta é possível preparar o pó com ação larvicida usando diretamente a suspensão obtida do processo de fermentação, antes do processo de centrifugação e liofilização.

O teste 3 (item 4.10., p.56) foi realizado com o objetivo de se avaliar a possibilidade de matar as larvas de *A. aegypti* em um maior volume de água usando uma quantidade mínima de pó larvicida. Para tal foi utilizada uma bandeja de 40 x 27 cm contendo água desclorada (3L). A quantidade de pó larvicida necessária para cobrir a superfície da bandeja foi de 4 mg (4 mg equivale a 0,092 mg de proteínas). Após 8 h de bioensaio observou-se a mortalidade de 100% das larvas.

No teste 4 (item 4.10., p. 56) foi possível verificar que mesmo após 45 dias de exposição à luz e temperatura ambiente (variação de temperatura de 15 – 30 °C), o pó larvicida em água, matou 100 % das larvas em 3 h de análise. O intuito deste teste foi de analisar o efeito residual do pó larvicida sem incidência direta de luz natural, condição semelhante à observada pelas larvas em condições de sombreamento.

O teste 5 (item 4.10., p. 56) foi realizado para avaliar se as larvas que eram mortas pelo pó larvicida poderiam liberar toxinas capazes de matar outras larvas. Através deste bioensaio foi possível verificar a mortalidade de todas larvas expostas à água deixada em contato com as larvas mortas por 24 h. Provavelmente, os cristais das proteínas de Bti ao serem ingeridos pelas larvas sofrem ação do pH intestinal, que os solubilizam e ativam as toxinas. As toxinas se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do intestino da larva, ocasionando a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que se intumescce e se rompe, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal do inseto (MONNERAT & BRAVO, 2000). Como ocorre um rompimento do tórax à cauda da larva, como observado na figura 26 (D) p.78, as toxinas dos cristais proteicos são liberadas, sendo letais para outras larvas vivas expostas ao meio.

No teste 6, as larvas do teste 5 foram maceradas, ao macerado foi adicionado água, que após filtrada foi utilizada em bioensaio com larvas. Após 24 h constatou-se mortalidade de 100% das larvas.

Os resultados obtidos no teste 5 e 6 são inéditos a nível mundial.

5.9. Determinação da atividade larvicida utilizando o pó larvicida (PL1) para controle do *Culex quinquefasciatus* (pernilongo)

Tendo em vista os bons resultados obtidos para a atividade do novo formulado desenvolvido nesse trabalho para o controle de larvas de *A. aegypti*, resolveu-se avaliar a ação desse formulado em condições de pré-campo para larvas de *Culex quinquefasciatus*. Essas avaliações foram efetuadas pelo grupo do Prof. João Antonio Cyrino Zequi na

Universidade Estadual de Londrina, parceiro deste projeto. Para tal foram usadas caixas de água de 500 L que foram dispostas em campo, conforme ilustrado na figura 27.

FIGURA 27 - ENSAIO EM CAMPO COM LARVAS DE *Culex quinquefasciatus*



O resultado da mortalidade das larvas de *Culex quinquefasciatus* ao longo de sete semanas está demonstrado na tabela 10 abaixo:

TABELA 10 - RESULTADO EM PORCENTAGEM DAS MORTALIDADES DAS LARVAS DE *Culex* MONITORADAS SEMANALMENTE

Semanas	1 ^a	2 ^o	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a
Mortalidade	100	99,30	100	95,58	96,17	95,99	86,71
% (média)		(98,66 – 99,40)		(98,81 – 93,75)	(96,05 – 92,46)	(99,40 – 91,66)	(92,26 – 78,27)

A mortalidade das larvas submetidas ao larvicida PL1 variou entre 100%, na primeira semana avaliada, e 86,71%, na sétima semana avaliada, o que denota a grande eficiência dessa formulação.

5.10. Testes ecotoxicológico

Serão relatados a seguir os resultados obtidos para os testes ecotoxicológicos utilizando os organismos-testes: *Daphnia magna*, alga *Desmodesmus subspicatus* e *Artemia salina*.

5.10.1. Teste com *Daphnia magna*

Para o teste com a *Daphnia magna* foram utilizadas suspensões filtradas e não filtradas que continham a formulação larvicida em pó desenvolvida em nosso laboratório.

Isso foi realizado para avaliar a toxicidade de eventuais substâncias que poderiam estar se solubilizando em água bem como do pó larvicida que apresenta baixa solubilidade em água.

A tabela 11 estão dispostos os dados do branco e as condições do ensaio realizado. Já as tabelas 12 - 14 mostram os resultados dos bioensaios utilizando as suspensões filtradas, sendo utilizado 10 mg / 100 mL (formulado / água destilada).

TABELA 11 - BRANCO DO TESTE ECOTOXICOLÓGICO PARA AS SUSPENSÕES FILTRADAS

Branco			
Número de organismos: 20		pH inicial: 7,12	
Dureza da água: 69,5		pH final: 7,05	Mortos: 0
OD inicial: 7,56		OD final: 6,57	
Início do ensaio: 12/10/2019 às 09h		Término do ensaio: 14/10/2019 às 9h	
Temperatura inicial:		Temperatura final:	
Máximo: 23,6	Mínimo: 19,8	Máximo: 23,9	Mínimo: 22,3

*OD – oxigênio dissolvido

TABELA 12 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 1ª SUSPENSÃO (LIOF. Bti – FILTRADO)

Teste com <i>Daphnia magna</i>					
Diluição	Organismos mortos	OD inicial mg.L ⁻¹	OD final mg.L ⁻¹	pH inicial	pH final
FT _D 1 (100%)	0	3,28	2,64	7,0	7,2

*FT_D – Fator de toxicidade para *Daphnia*

TABELA 13 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 2ª SUSPENSÃO (PL1 – FILTRADO)

Teste com <i>Daphnia magna</i>					
Diluição	Organismos mortos	OD inicial mg.L ⁻¹	OD final mg.L ⁻¹	pH inicial	pH final
FT _D 1 (100%)	0	4,22	3,95	7,8	7,6

*FT_D – Fator de toxicidade para *Daphnia*

TABELA 14 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 3ª SUSPENSÃO (EXCIPIENTE – FILTRADO)

Teste com <i>Daphnia magna</i>					
Diluição	Organismos mortos	OD inicial mg.L ⁻¹	OD final mg.L ⁻¹	pH inicial	pH final
FT _D 1 (100%)	0	3,76	3,25	7,2	7,3

*FT_D – Fator de toxicidade para *Daphnia*

Para o resultado do teste toxicológico utilizando as suspensões filtradas, foi possível perceber que não houve morte do organismo-teste em nenhum dos casos, indicando não haver toxicidade da solução obtida após contato com o liofilizado de Bti, com o excipiente usado na preparação do pó larvicida e nem com o pó larvicida já formulado.

A tabela 15 mostra os dados do branco e as condições do ensaio realizado para as suspensões não filtradas.

O teste revelou ausência de toxicidade aguda e crônica no organismo-teste para todas suspensões não filtradas utilizadas (TABELA 16 - 21).

TABELA 15 - BRANCO DO TESTE ECOTOXICOLÓGICO PARA AS SUSPENSÕES SEM FILTRAÇÃO

Branco			
Número de organismos: 20		pH inicial: 7,0	
Dureza da água: 69,5		pH final: 7,0	Mortos: 0
OD inicial: 8,23		OD final: 7,15	
Início do ensaio: 12/11/2019 às 09h		Término do ensaio: 14/11/2019 às 9h	
Temperatura inicial:		Temperatura final:	
Máximo: 23,5	Mínimo: 22,8	Máximo: 24,6	Mínimo: 22,9

*OD – oxigênio dissolvido

TABELA 16 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 4ª SUSPENSÃO (LIOF. Bti (2 mg) – SEM FILTRAÇÃO)

Ensaio definitivo - Liof de Bti - 2 mg					
Diluição	Organismos mortos	OD Inicial mg.L⁻¹	OD Final mg.L⁻¹	pH inicial	pH final
FT_D 1 (100%)	0	5,26	4,82	7	7

*FT_D – Fator de toxicidade para Daphnia

TABELA 17 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 4ª SUSPENSÃO (LIOF. Bti (10 mg) – SEM FILTRAÇÃO)

Ensaio definitivo - Liof de Bti – 10 mg					
Diluição	Organismos mortos	OD Inicial mg.L ⁻¹	OD Final mg.L ⁻¹	pH inicial	pH final
FT_D 1 (100%)	0	5,22	5,22	7	7

*FT_D – Fator de toxicidade para Daphnia

TABELA 18 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 5ª SUSPENSÃO (PL1 (2 mg) – SEM FILTRAÇÃO)

Ensaio definitivo - PL1 – 2 mg					
Diluição	Organismos mortos	OD Inicial mg.L ⁻¹	OD Final mg.L ⁻¹	pH inicial	pH final
FT_D 1 (100%)	0	6,15	5,85	7	7

*FT_D – Fator de toxicidade para Daphnia

TABELA 19 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 5ª SUSPENSÃO (PL1 (10 mg) – SEM FILTRAÇÃO)

Ensaio definitivo - PL1 - 10 mg					
Diluição	Organismos mortos	OD Inicial mg.L ⁻¹	OD Final mg.L ⁻¹	pH inicial	pH final
FT_D 1 (100%)	0	2,89	2,15	7	7

*FT_D – Fator de toxicidade para Daphnia

TABELA 20 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 5ª SUSPENSÃO (EXCIPIENTE (2 mg) – SEM FILTRAÇÃO)

Ensaio definitivo - Excipiente – 2 mg					
Diluição	Organismos mortos	OD Inicial mg.L ⁻¹	OD Final mg.L ⁻¹	pH inicial	pH final
FT_D 1 (100%)	0	4,16	3,64	7	7

*FT_D – Fator de toxicidade para Daphnia

TABELA 21 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA 5ª SUSPENSÃO (EXCIPIENTE (10 mg) – SEM FILTRAÇÃO)

Ensaio definitivo - excipiente – 10 mg					
Diluição	Organismos mortos	OD Inicial mg.L ⁻¹	OD Final mg.L ⁻¹	pH inicial	pH final
FT _D 1 (100%)	0	2,89	2,15	7	7

*FT_D – Fator de toxicidade para Daphnia

Nenhum organismo apresentou imobilidade durante o teste, assim não foi apresentada ecotoxicidade para nenhuma das suspensões utilizadas, sendo estas filtradas ou não. E mesmo nos extratos mais concentrados, em que a quantidade de sólidos não solúveis era maior, os organismos conseguiram nadar livremente pelos grânulos.

5.10.2. Teste com alga *Desmodesmus subspicatus*

Foi analisado por fotometria na faixa de 590 nm o crescimento das algas em cada material utilizado (branco, liof. de Bti, PL1 e excipiente).

O aumento dos valores na coluna de 590 nm (comparação entre o ‘inicial e final’) entre o 0 ao 3º dia, quer dizer que as algas conseguiram se desenvolver, e que não houve interferente no crescimento delas, sendo assim, as amostras podem ser consideradas não tóxicas.

Logo, o teste revelou ausência de toxicidade no organismo-teste para todos os materiais utilizados (TABELA 22 e 23).

TABELA 22 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA AMOSTRA - FILTRADO

Lux: 4515								
Dia	0	1º	2º	3º	Início		Fim	
Temperatura máxima	26,8	25,2	25,7	26,9	Data 14/10/2019	Hora 11:00	Data 17/10/2019	Hora 11:00
Temperatura mínima	23,5	22,9	22,6	24,2	pH: 8			
FT	%	Inicial (590 nm)			Final (590 nm)			
Branco	0	0,012	0,01	0,012	0,193	0,198	0,196	

Liof. Bti	100	0,018	0,017	0,018	0,243	0,247	0,244
PL1	100	0,01	0,013	0,01	0,239	0,244	0,236
Excipiente	100	0,01	0,012	0,01	0,196	0,198	0,199

TABELA 23 - TESTE ECOTOXICOLÓGICO DA AMOSTRA – SEM FILTRAÇÃO

Lux: 4515								
Dia	0	1°	2°	3°	Início		Fim	
Temperatura máxima	23,8	24,6	24,2	24,1	Data 11/11/2019	Hora 11:00	Data 14/11/2019	Hora 11:00
Temperatura mínima	22,6	23,1	23,1	23,2				
pH	8	8	8					
Branco	0,007	0,005	0,008		0,456	0,455	0,469	
Liof. Bti	Inicial (590 nm)				Final (590 nm)			
(2 mg)	0,009	0,009	0,007		0,459	0,460	0,462	
Liof. Bti	0,008	0,01	0,009		0,474	0,451	0,467	
(10 mg)								
PL1	0,008	0,008	0,0008		0,46	0,46	0,465	
(2 mg)								
PL1	0,009	0,006	0,006		0,474	0,451	0,467	
(10 mg)								
Excipiente	0,009	0,007	0,009		0,455	0,461	0,458	
(2 mg)								
Excipiente	0,009	0,009	0,008		0,475	0,455	0,455	
(10 mg)								

O controle apresentou aumento do sinal, o que significa que houve crescimento da alga.

As amostras também apresentaram crescimento algal superior ao inicial e ao compararmos com o controle, verificou-se que a taxa de crescimento foi similar.

Logo, não foi apresentada ecotoxicidade para nenhuma das amostras utilizadas.

5.10.3. Teste com *Artemia salina*

O ensaio de letalidade frente à *Artemia salina* é uma metodologia extensamente utilizada na linha de pesquisa de produtos naturais para avaliar o potencial tóxico de extratos e substâncias isoladas. Apesar de ser relativamente simples, este ensaio tem a capacidade de gerar informações de grande utilidade de forma rápida, econômica e com reprodutibilidade e tem sido empregado para a avaliação de novos medicamentos, e de qualquer outra substância de interesse que entre em contato com organismo aquáticos (HIROTA et al, 2012).

Segundo a OMS, são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL50 abaixo de 1000 ppm (Meyer *et al.*, 1982).

A melhor formulação com atividade larvívora em desenvolvimento (PL1) não apresentou toxicidade frente a *Artemia salina*, uma vez que não ocorreu morte em nenhum dos tratamentos avaliados (TABELA 24).

TABELA 24 - ENSAIO TOXICOLÓGICO UTILIZANDO *Artemia salina*

Amostras	massa (mg/mL)	Volume final das amostras (solução salina (mL))	Quantidade de <i>Artemia</i> <i>salina</i>	Mortalidade (%)
Controle	0	10	10	0
Liofilizado de Bti	0,1	10	10	0
Liofilizado de Bti	0,075	10	10	0
Liofilizado de Bti	0,05	10	10	0
Liofilizado de Bti	0,025	10	10	0
Excipiente	0,1	10	10	0
Excipiente	0,075	10	10	0
Excipiente	0,05	10	10	0
Excipiente	0,025	10	10	0

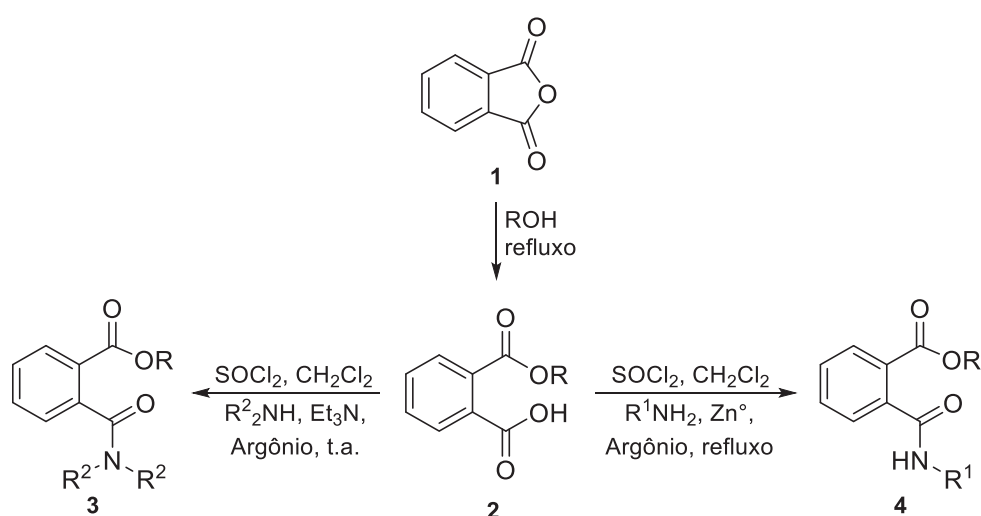
Formulado larvícida	0,1	10	10	0
Formulado larvícida	0,075	10	10	0
Formulado larvícida	0,05	10	10	0

A ausência de toxicidade dessa formulação, bem como do excipiente empregado nela e do material liofilizado contendo as proteínas do Bti, evidencia o potencial de aplicação dessa formulação para o controle de larvas de vários gêneros de mosquitos envolvidos em importantes casos de saúde pública como *Aedes* e *Anopheles*.

5.11. Síntese de novos repelentes derivados do anidrido ftálico

Uma série de substâncias candidatas a repelente foram sintetizadas a partir do anidrido ftálico **1**, um reagente de baixo custo. A síntese desses derivados foi realizada no intuito de desenvolver um novo repelente, de fácil obtenção, baseado no artigo publicado por Kain (2013), no qual apresenta possíveis estruturas de repelentes de mosquitos. As derivatizações do anidrido ftálico consistem na abertura do anel anidrido através da reação com álcoois primários levando à formação de um grupo éster, com posterior conversão do ácido carboxílico a amidas (FIGURA 28).

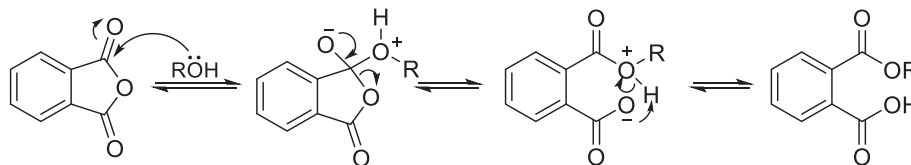
FIGURA 28- SÍNTESE DE DERIVADOS DO ANIDRIDO FTÁLICO



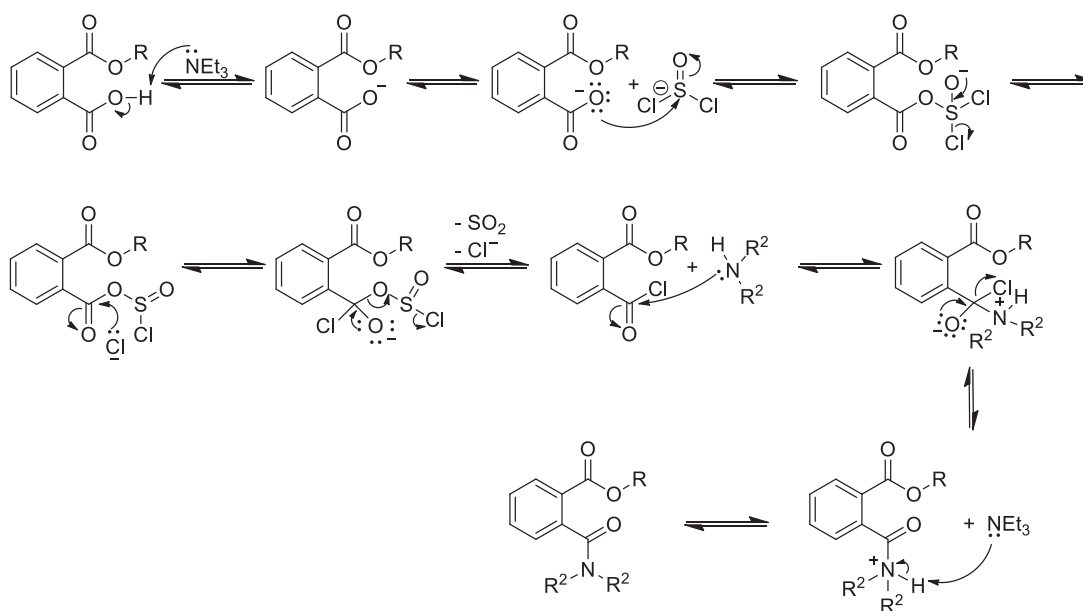
A síntese desses derivados foi realizada em duas etapas reacionais, inicialmente o anel anidrido foi aberto na presença do álcool de interesse sob refluxo. Entretanto, quando se utilizou álcoois de cadeia longa foi necessária a adição de ácido fosfórico em quantidade catalítica (ZENKEVICH e FAKHRETDINOVA, 2016). O grupo amida foi obtido através da reação de amidação de ácido carboxílico na presença de amina. Para isso o grupo carboxila foi transformado em um bom grupo abandonador na presença de cloreto de tionila, e a seguir houve o ataque nucleofílico da amina à carbonila produzindo o grupo amida. Foram usados dois procedimentos para a obtenção do grupo amida. O primeiro foi um procedimento mais brando conduzido à temperatura ambiente juntamente com a base trietilamina. Este procedimento é muito eficiente quando aminas secundárias são utilizadas. Já na síntese com aminas primárias, observou-se que a trietilamina desprotonava o nitrogênio da amida formada e ocorria o ataque nucleofílico do nitrogênio à carbonila do éster levando à formação da ftalimida. Por isso as reações com aminas primárias foram conduzidas na presença de cloreto de tionila sob refluxo e com o uso de zinco em pó. Na figura 29 é demonstrado o mecanismo clássico para a obtenção dos repelentes estudados.

FIGURA 29 - MECANISMO PARA OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS CANDIDATOS A REPELENTE

Abertura do anel anidrido com álcoois:



Obtenção das amidas de interesse



Os compostos sintetizados foram caracterizados por ressonância magnética nuclear - RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas.

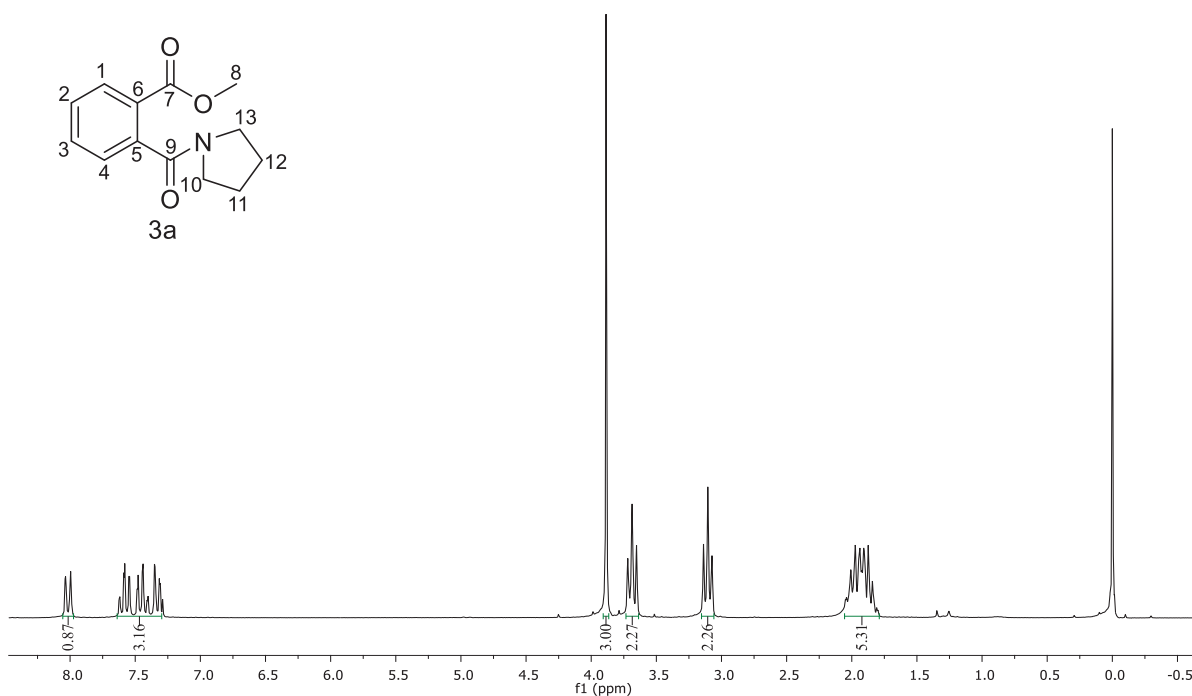
A seguir serão descritas as caracterizações de alguns dos compostos sintetizados. Algumas estão sendo mantidas em sigilo por apresentarem potencial de aplicação na síntese de um novo repelente. No entanto, todas as substâncias sintetizadas foram caracterizadas conforme descrito para as substâncias a seguir.

No espectro de RMN de ^1H do composto 2-(pirrolidil – 1- carbonil) benzoato de metila (**3a**) (FIGURA 30), observou-se um multipletto entre 2,06 e 1,79 ppm referente aos hidrogênios mais protegidos ligados ao carbono-11 e 12 (C-11 e C-12) do grupo amida. Em 3,11 ppm observou-se um tripleto com constante de acoplamento (J) de 6,5 Hz e outro tripleto em 3,69 ppm com constante de acoplamento (J) 6,8 Hz referentes aos hidrogênios do C-13 e C-10. Em 3,89 ppm observou-se um simpleto característico dos hidrogênios

ligados ao carbono da metila (C-8). Em 7,33 ppm é possível observar um duplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 7,2 e 1,1 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio do C-4. Em 7,44 ppm observou-se um triplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 7,7 e 1,4 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio do C-3 e em 7,58 ppm outro triplo dubleto com constante de acoplamento (J) 7,5 e 1,4 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio do C-2. Em 8,02 pode-se observar um duplo dubleto com constante de acoplamento (J) 7,5 e 1,1 Hz referente ao hidrogênio ligado ao carbono mais desblindado C-1.

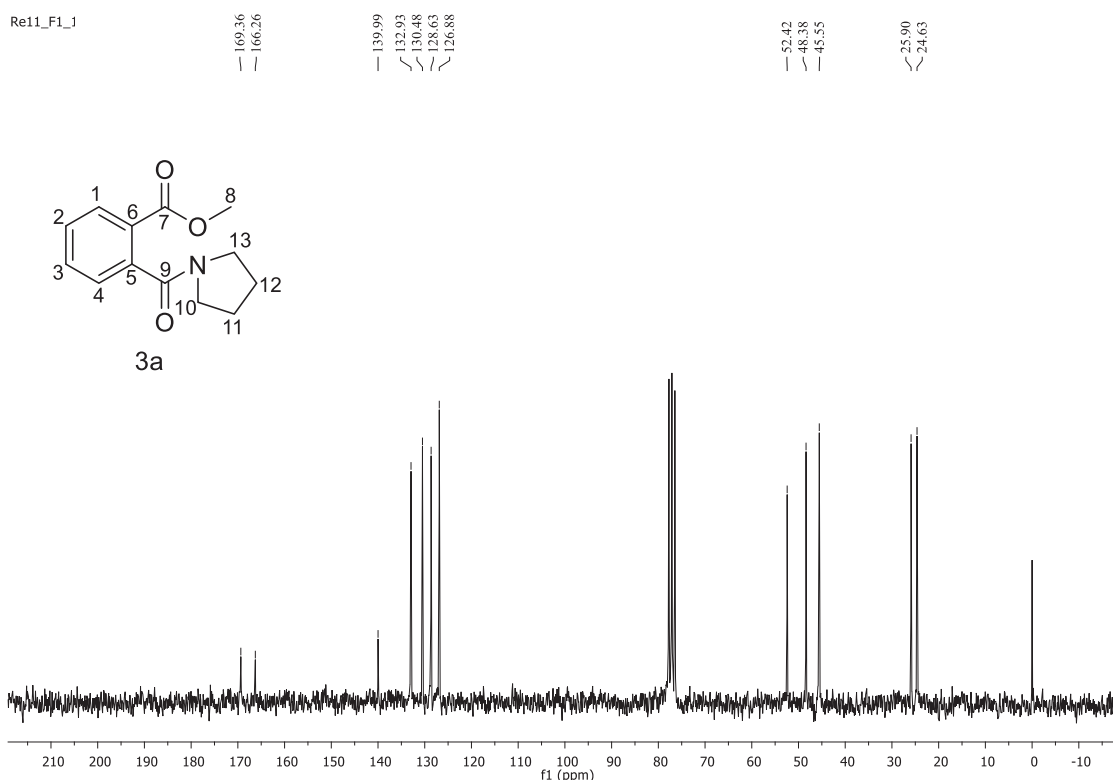
FIGURA 30 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL) BENZOATO DE METILA (3a)

Re11_F1_1



No espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-(pirrolidil-1-carbonil) benzoato de metila (**3a**) (FIGURA 31), observou-se sinais em 169,36 ppm correspondente à carbonila C-7 do éster e em 166,26 ppm o sinal referente à carbonila C-9 da amida. Os sinais na faixa de 139,99 e 126,88 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. Em 52,42 ppm observa-se o sinal do C-8 da metila, em 48,38 ppm corresponde ao sinal do C-13 e o sinal em 45,55 ppm corresponde ao C-10. Sinal em 25,90 e 24,63 ppm correspondem aos C-12 e C-11 respectivamente.

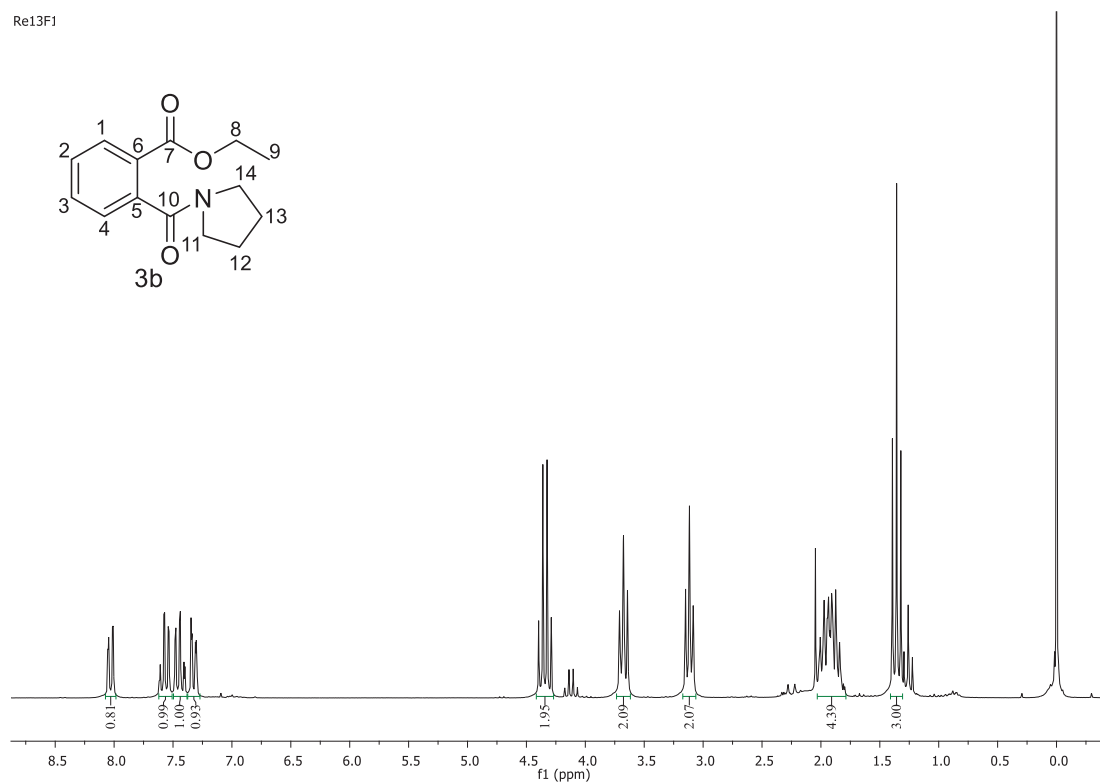
FIGURA 31 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3a)



No espectro de RMN de ^1H do composto 2-(pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de etila (**3b**) (FIGURA 32) observou-se um tripleto em 1,36 ppm com constante de acoplamento (J) de 7,1 Hz referente aos hidrogênios do carbono da metila, C- 9 e um multipletto entre 2,03 e 1,79 ppm referente aos hidrogênios do grupo amida (C-12 e C-13). Em 3,12 ppm é possível observar um tripleto com constante de acoplamento (J) de 6,5 Hz e outro tripleto em 3,68 ppm com constante de acoplamento (J) de 6,8 Hz que são referentes aos hidrogênios do grupo amida (C-11 e C-14). Em 4,34 ppm há um quarteto com constante de acoplamento (J) de 7,1 Hz referentes aos hidrogênios do grupo éster (C-8). Em 7,32 ppm observou-se um duplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 7,4 e 1,4 Hz referente aos desdobramentos dos hidrogênios aromáticos menos desblindado (C-4). Em 7,44 ppm pôde-se observar um triplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 7,6 e 1,4 Hz referente ao hidrogênio aromático do C-3 e outro triplo dubleto em 7,57 ppm com constante de acoplamento (J) de 7,5 e 1,4 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio do C-2. Em 8,03 ppm observou-se um duplo dubleto, mais

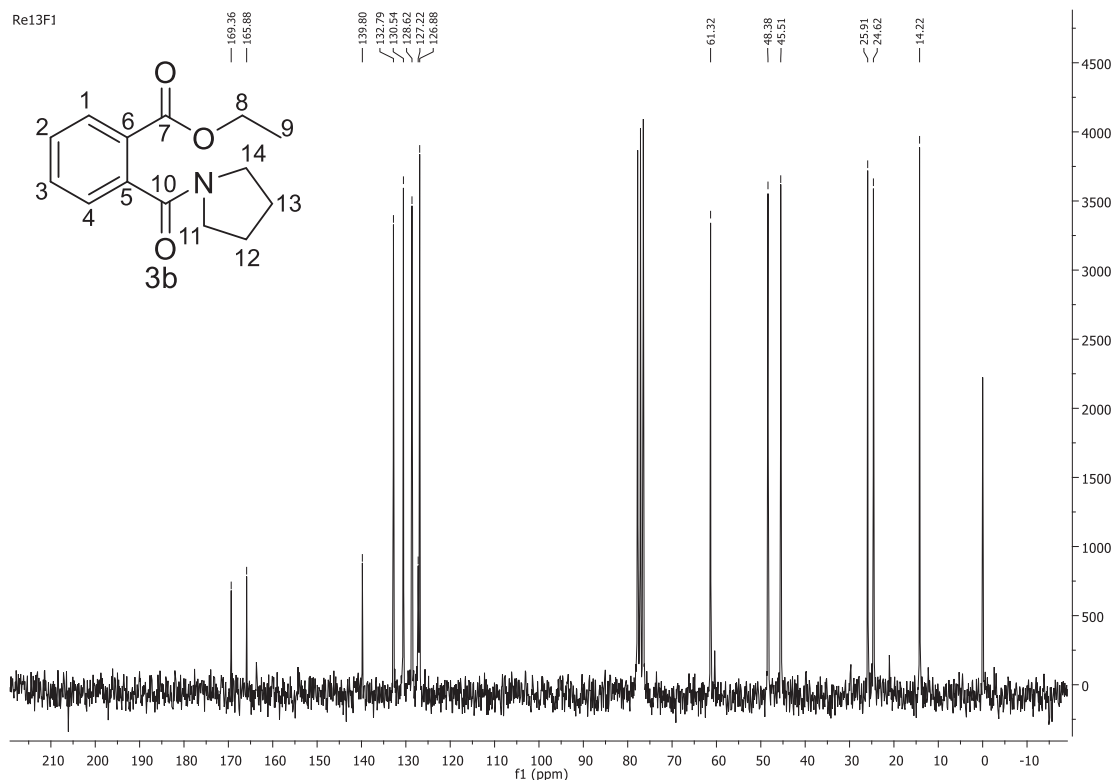
desblindado, com constante de acoplamento (J) de 7,8 e 1,3 Hz referente ao hidrogênio do C-1 do anel aromático.

FIGURA 32 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (**3b**)



No espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-(pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de etila (**3b**) (FIGURA 33), observou-se sinais em 169,36 ppm correspondente à carbonila C-7 do éster e em 165,88 ppm referente à carbonila C-10 da amida. Os sinais na faixa de 139,80 e 126,88 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. O sinal em 61,32 ppm corresponde ao C-8 ligado ao oxigênio e em 48,38 e 45,51 ppm sinais correspondentes ao C-14 e C-11 ligados diretamente ao nitrogênio. Os sinais em 25,91 e 24,62 ppm são referentes aos C-13 e C-12 do grupo amida. E o sinal referente a metila (C-9) aparece em 14,22 ppm.

FIGURA 33 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3b)

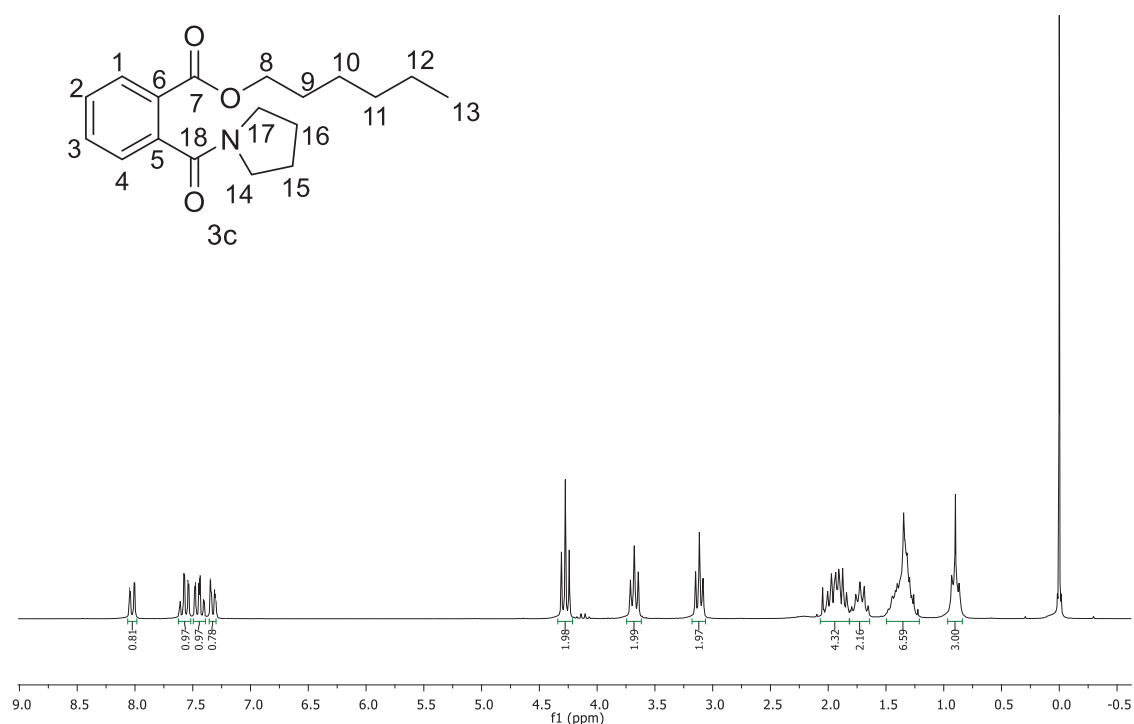


No espectro de RMN de ^1H do composto 2-(pirrolidil – 1- carbonil)-benzoato de hexila (**3c**) (FIGURA 34) observou-se um tripleto em 0,9 ppm com constante de acoplamento (J) de 6,5 Hz referente ao hidrogênio do carbono da metila, C-13, e três multipletos sequenciais: um multipletto entre 1,5 -1,2 ppm, integrando para seis hidrogênios, referente aos hidrogênios do grupo éster dos C-12, C-11 e C-10, outro multipletto entre 1,81 – 1,64 ppm referente aos hidrogênios do C-9 do grupo éster e um multipletto entre 2,07 – 1,82 ppm referentes aos hidrogênios do grupo amida (C-16 e C-15). Em 3,12 ppm é possível observar um tripleto com constante de acoplamento (J) de 6,5 Hz e outro tripleto em 3,68 ppm com constante de acoplamento (J) de 6,8 Hz que são referentes aos hidrogênios dos carbonos ligados diretamente ao nitrogênio do grupo amida (C-17 e C-14). Em 4,8 ppm há um tripleto com constante de acoplamento (J) 6,8 Hz referente aos hidrogênios do carbono do grupo éster ligado diretamente ao oxigênio (C-8). Em 7,33 ppm observou-se um duplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 7,6 e 1,7 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio aromático menos desblindado (C-

4). Em 7,44 ppm pôde-se observar um triplo dubleto com constante de acoplamento 7,6 e 1,5 Hz referente ao hidrogênio aromático do C-3 e outro triplo dubleto em 7,57 ppm com constante de acoplamento 7,5 e 1,4 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio do C-2. Em 8,02 ppm observou-se um duplo dubleto, mais desblindado, com constante de acoplamento (J) de 7,3 e 1,3 Hz referente ao hidrogênio do C-1 do anel aromático.

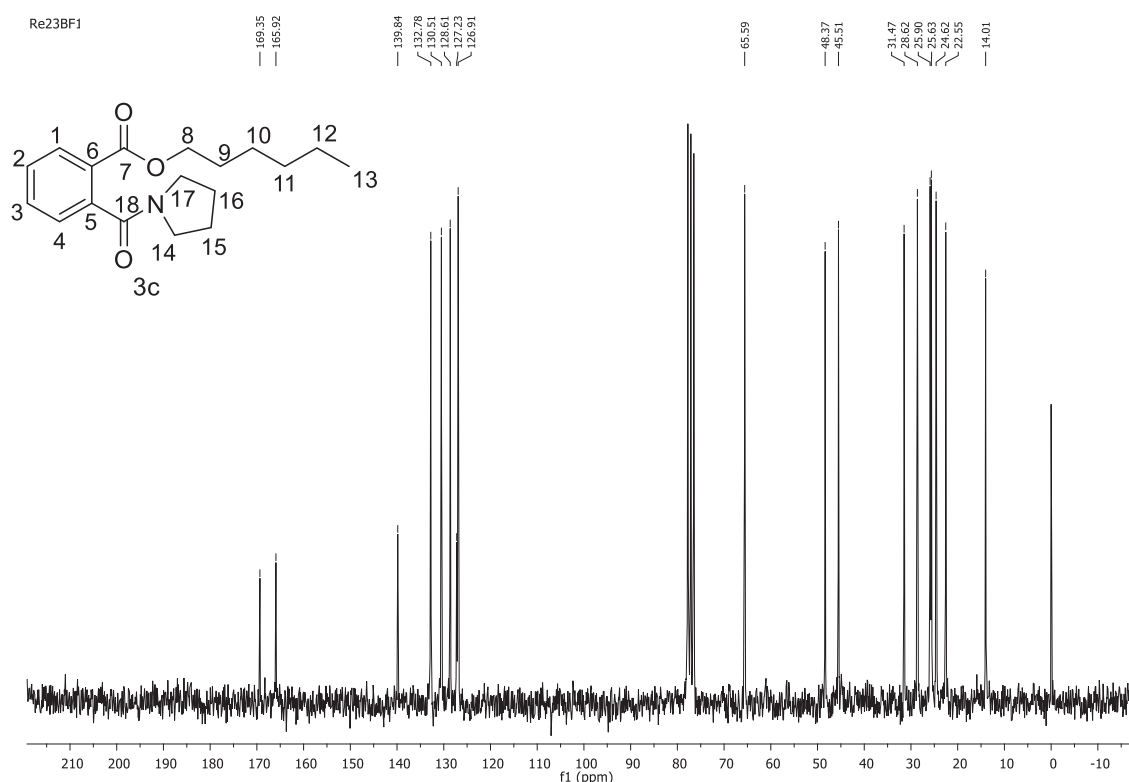
FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO 2(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3c)

Re23BF1



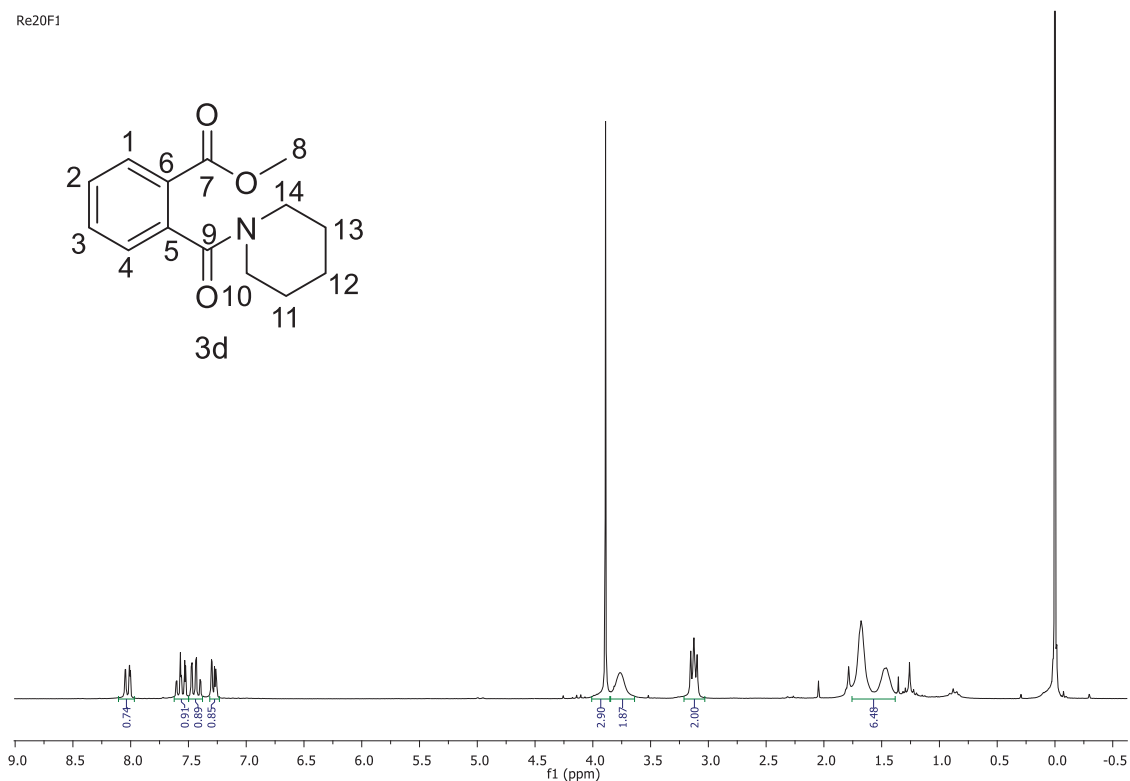
No espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-(pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de hexila (**3c**) (FIGURA 35), observou-se os sinais em 169,35 ppm correspondente à carbonila C-7 do éster e em 165,92 ppm referente à carbonila C-18 da amida. Os sinais na faixa entre 139,84 e 126,91 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. O sinal em 65,59 ppm corresponde ao C-8 ligado diretamente ao oxigênio do grupo éster e os sinais em 48,37 e 45,51 ppm correspondem aos C-17 e C-14 ligados diretamente ao nitrogênio. Os sinais em 31,47 e 28,62 ppm são referentes aos C-9 e C-10 do grupo éster. Os sinais em 25,9 e 25,36 ppm referem-se aos C-15 e C-16 do grupo amida. O sinal em 24,62 ppm se refere ao C-11 e o sinal em 22,55 ppm designa-se ao C-12. O sinal referente a metila, C-13, aparece em 14,01 ppm.

FIGURA 35 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3c)



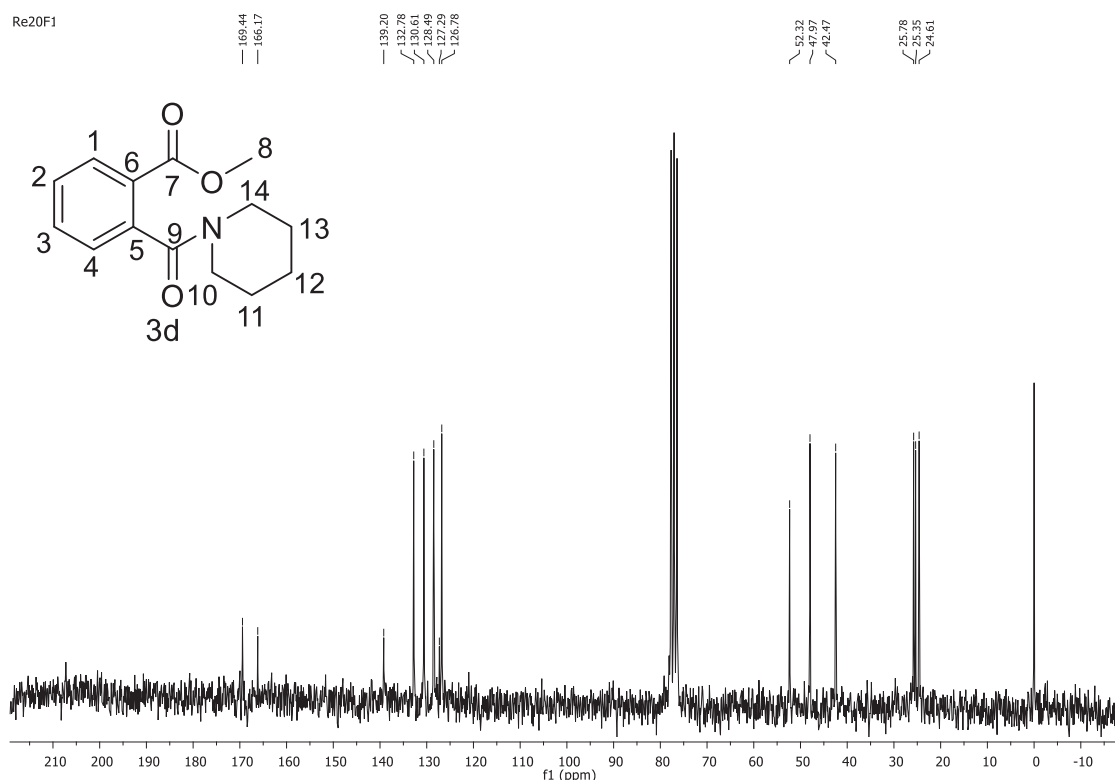
No espectro de RMN de ^1H do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de metila (**3d**) (FIGURA 36) observou-se um multipeto entre 1,75 e 1,38 ppm, integrando para seis hidrogênios, referente aos hidrogênios do grupo amida (C-11, C-12 e C-13). Em 3,12 ppm pôde-se observar um triplete com constante de acoplamento (J) de 5,5 Hz e um multipeto entre 3,84 e 3,65 ppm referentes aos hidrogênios dos carbonos ligados ao nitrogênio (C-10 e C-14). Em 3,89 ppm observa-se um simpleto referente ao grupo metila (C-8). Em 7,28 ppm observou-se um duplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 5,8 e 1,68 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio aromático menos desblindados (C-4). Em 7,43 ppm pôde-se observar um triplo dubleto com constante de acoplamento de 7,6 e 1,5 Hz referente ao hidrogênio do C-3 e outro triplo dubleto em 7,57 ppm com constante de acoplamento (J) de 7,5 e 1,4 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio do C-2. Em 8,03 ppm observou-se um duplo dubleto, mais desblindado, com constante de acoplamento (J) de 7,8 e 1,4 Hz referente ao hidrogênio do C-1 do anel aromático.

FIGURA 36 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3d)



No espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de metila (**3d**) (FIGURA 37), observou-se sinais em 169,44 ppm correspondente à carbonila C-7 do éster e em 166,17 ppm referente à carbonila C-9 da amida. Os sinais na faixa entre 139,20 e 126,78 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. O sinal em 52,32 ppm corresponde ao C-8 da metila ligada ao oxigênio e os sinais em 47,97 e 42,47 ppm correspondem ao C-10 e C-14 ligados diretamente ao nitrogênio. Os sinais em 25,78 e 25,35 ppm são referentes aos C-11 e C-13 do grupo amida e o sinal em 24,61 ppm refere-se ao C-12.

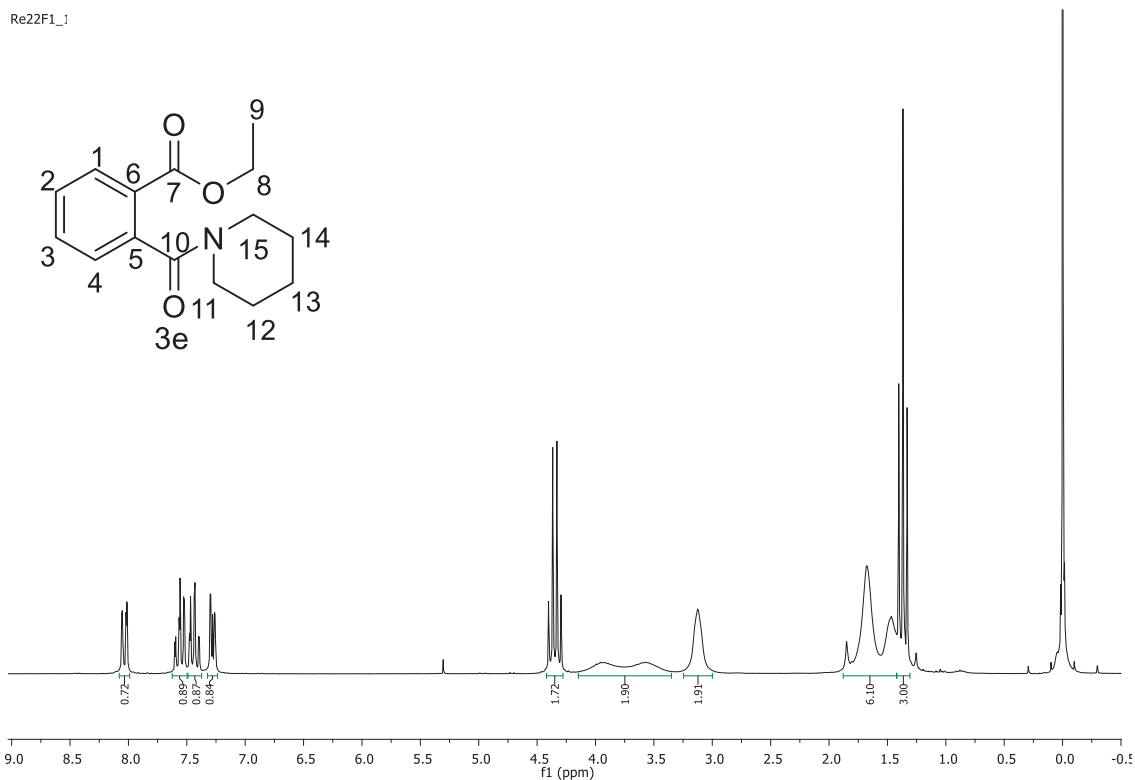
FIGURA 37 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO COMPOSTO 2(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3d)



No espectro de RMN de ^1H do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de etila (**3e**) (FIGURA 38) observou-se um tripleto em 1,37 ppm com constante de acoplamento (J) de 7,1 Hz referente aos hidrogênios da metila do C-9. Entre 1,9 e 1,42 tem-se um multipletto, integrando para seis hidrogênios, que corresponde aos hidrogênios dos carbonos do grupo amida (C-12, C-13 e C-14). Observou-se em seguida mais dois multiplettos, um entre 3,29 e 2,98 ppm e outro entre 4,20 e 3,33 ppm referentes aos hidrogênios dos carbonos C-11 e C-15 ligados diretamente ao nitrogênio do grupo amida. Em 4,35 ppm observou-se um quarteto com constante de acoplamento (J) de 7,71 Hz referente aos hidrogênios do C-8 ligado do oxigênio do grupo éster. Em 7,28 ppm pode-se observar um duplo dubleto com constante de acoplamento (J) 7,3 e 1,5 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio aromático menos desblindado (C-4). Em 7,43 ppm observou-se um triplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 7,6 e 1,5 Hz referente ao hidrogênio do C-3 e outro triplo dubleto em 7,56 ppm com constante de acoplamento (J) de 7,5 e 1,5 Hz referente ao hidrogênio do C-2. Em 8,03 ppm observou-se um duplo

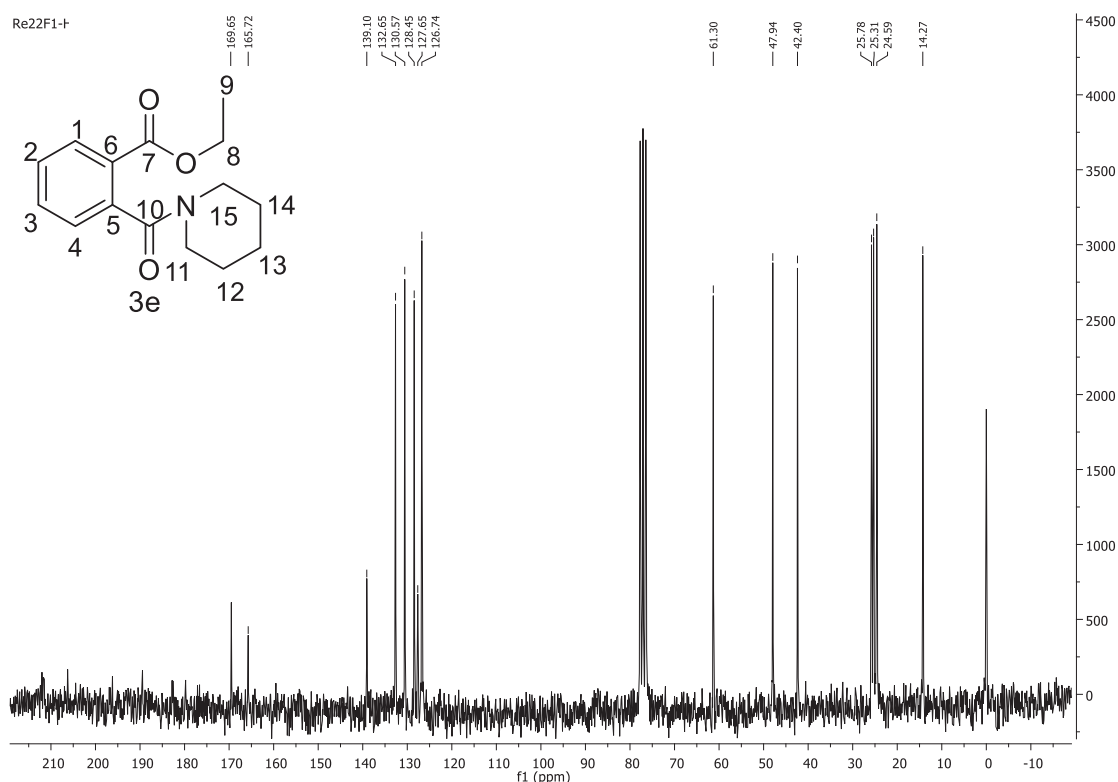
dubleto, mais desblindado, com constante de acoplamento (J) de 7,9 e 1,7 Hz referente ao hidrogênio do C-1 do anel aromático.

FIGURA 38 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3e)



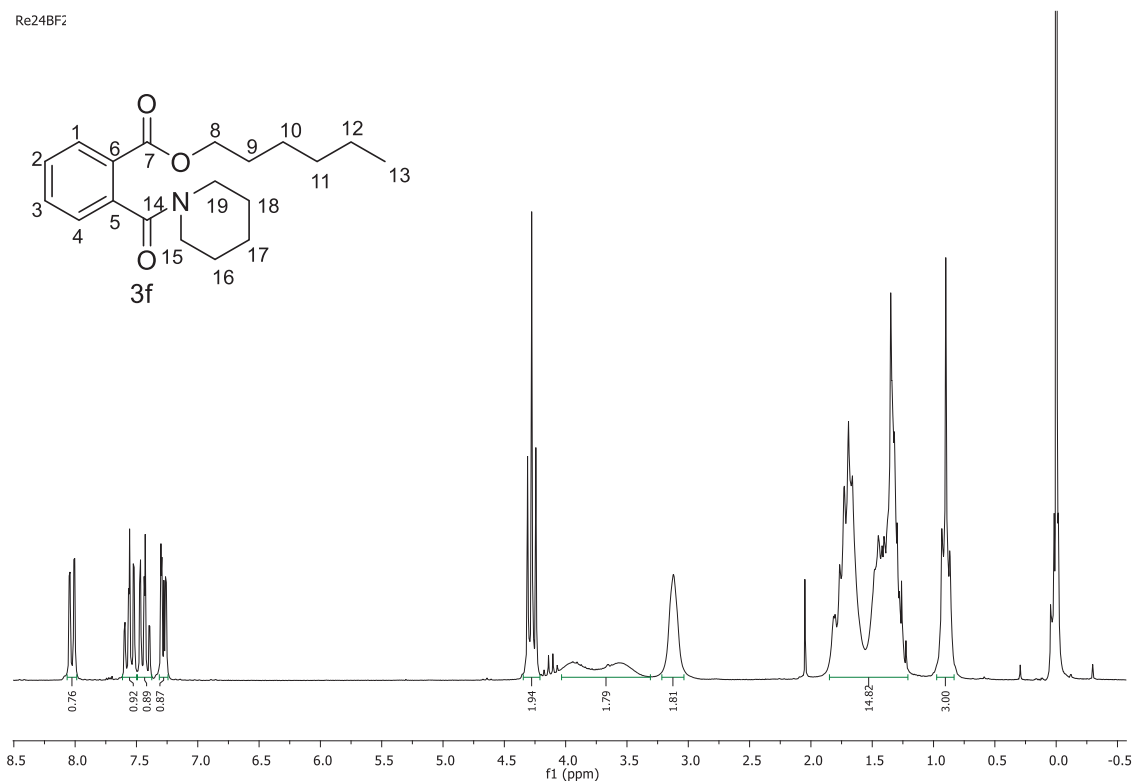
No espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de etila (3e) (FIGURA 39), observou-se os sinais em 169,65 ppm correspondente à carbonila C-7 do éster e em 165,72 ppm referente à carbonila C-10 da amida. Os sinais na faixa de 139,10 e 126,74 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. O sinal em 61,30 ppm corresponde ao C-8 ligado ao oxigênio e os sinais em 47,94 e 42,40 ppm correspondem ao C-11 e C-15 ligados diretamente ao nitrogênio. Os sinais 25,78 e 25,31 ppm equivalem aos C-12 e C-14 do grupo amida. O sinal em 24,59 ppm corresponde ao C-13 da amida e o sinal referente a metila C-9 aparece em 14,27 ppm.

FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (3e)



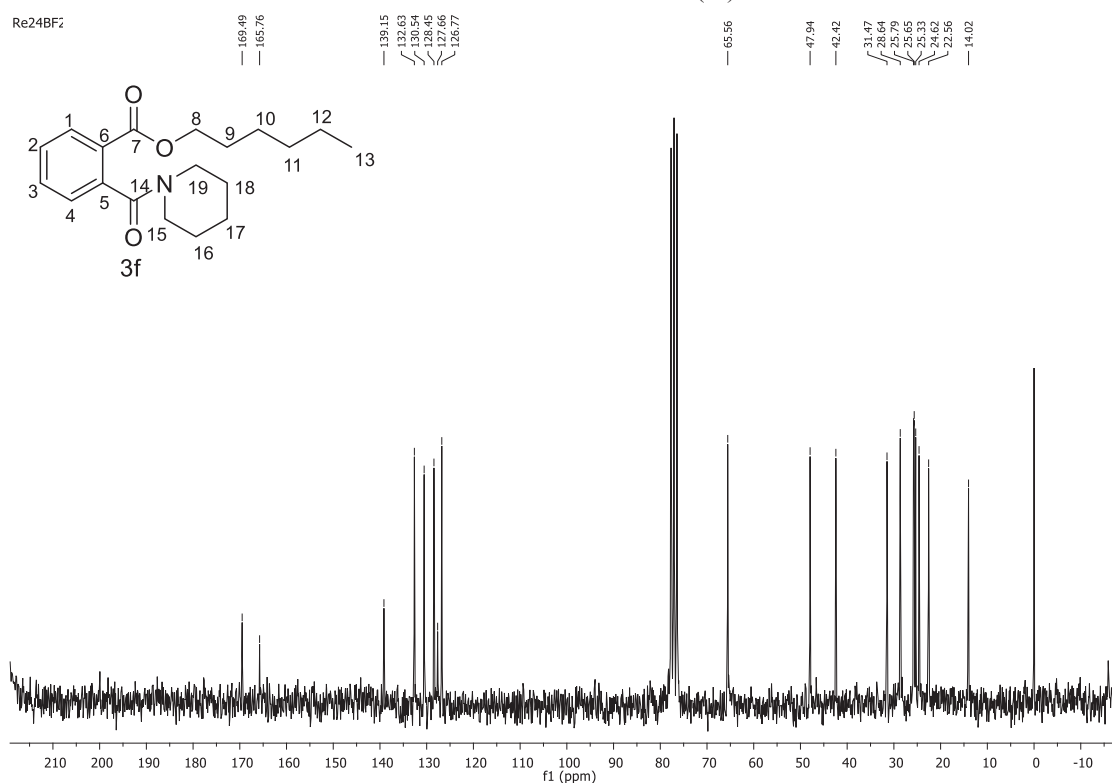
No espectro de RMN de ^1H do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de hexila (**3f**) (FIGURA 40) observou-se um tripleto em 0,9 ppm com constante de acoplamento (J) de 6,4 Hz referente aos hidrogênios da metila (C-13). Observou-se um multipletto entre 1,86 e 1,21 ppm referentes aos desdobramentos dos hidrogênios dos C-9, 10, 11, 12, 16, 17 e 18. Em seguida observou dois multipletos, um entre 3,26 e 3,00 ppm e outro entre 4,04 e 3,31 ppm referentes aos hidrogênios dos C-15 e C-19 ligados diretamente ao nitrogênio. Em 4,28 ppm observou-se um tripleto com constante de acoplamento (J) de 6,8 Hz referente ao C-8 ligado diretamente ao oxigênio do grupo éster. Em 7,28 ppm pode-se observar um duplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 7,5 e 1,4 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio aromático menos desblindado (C-4). Em 7,43 ppm observou-se um triplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 7,6 e 1,5 Hz referente ao C-3 e outro triplo dubleto em 7,56 ppm com constante de acoplamento (J) de 7,5 e 1,4 Hz referente ao desdobramento do hidrogênio do C-2. Em 8,03 ppm observou-se um duplo dubleto, mais desblindado, com constante de acoplamento (J) de 7,7 e 1,5 Hz referente ao hidrogênio do C-1 do anel aromático.

FIGURA 40 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3f)



No espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de hexila (**3f**) (FIGURA 41), observou-se sinais em 169,49 ppm correspondente à carbonila C-7 do éster e em 165,76 ppm o sinal referente à carbonila C-14 da amida. Os sinais na faixa de 139,15 e 126,77 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. O sinal em 65,56 ppm corresponde ao C-8 ligado ao oxigênio e em 47,94 e 42,42 ppm sinais correspondentes ao C-15 e C-19 ligados diretamente ao nitrogênio. O sinal 31,47 ppm corresponde ao C-9, o sinal em 28,64 ppm ao C-10, sinal em 25,79 ppm corresponde ao C-11, os sinais em 25,65 e 25,33 ppm correspondem aos C-16 e C-18. O sinal em 24,62 ppm corresponde ao C-17, sinal em 22,56 ppm refere-se ao C-12 e o sinal referente a metila (C-13) aparece em 14,02 ppm.

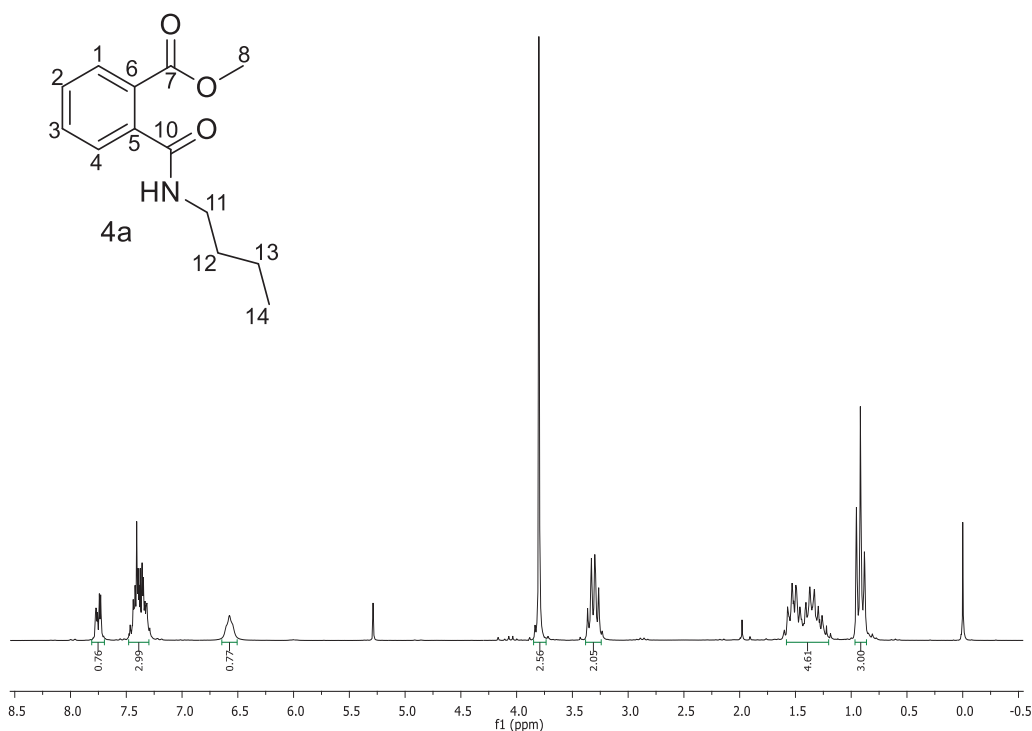
FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE HEXILA (3f)



No espectro de RMN de ^1H do composto 2-(butilcabamoil)-benzoato de metila (**4a**) (FIGURA 42) observou-se um triplete em 0,92 ppm com constante de acoplamento (J) de 7,2 Hz referente aos hidrogênios da metila do C-14 do grupo amida. Entre 1,62 e 1,19 ppm observou-se um multipeto referente aos desdobramentos dos hidrogênios dos C-12 e C-13. Observou-se também outro multipeto entre 3,39 e 3,21 ppm referente aos hidrogênios do C-11 ligado diretamente ao nitrogênio. Em 3,8 ppm tem-se um simpleto referente ao carbono da metila do grupo éster (C-8). Em 6,58 ppm observou-se um simpleto largo referente ao hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio do grupo amida. Entre 7,48 e 7,28 ppm tem-se um multipeto referente aos hidrogênios dos carbonos do anel aromático (C-2, 3 e 4) e outro multipeto entre 7,81 e 7,69 ppm referente ao hidrogênio mais desblindado do anel aromático (C-1).

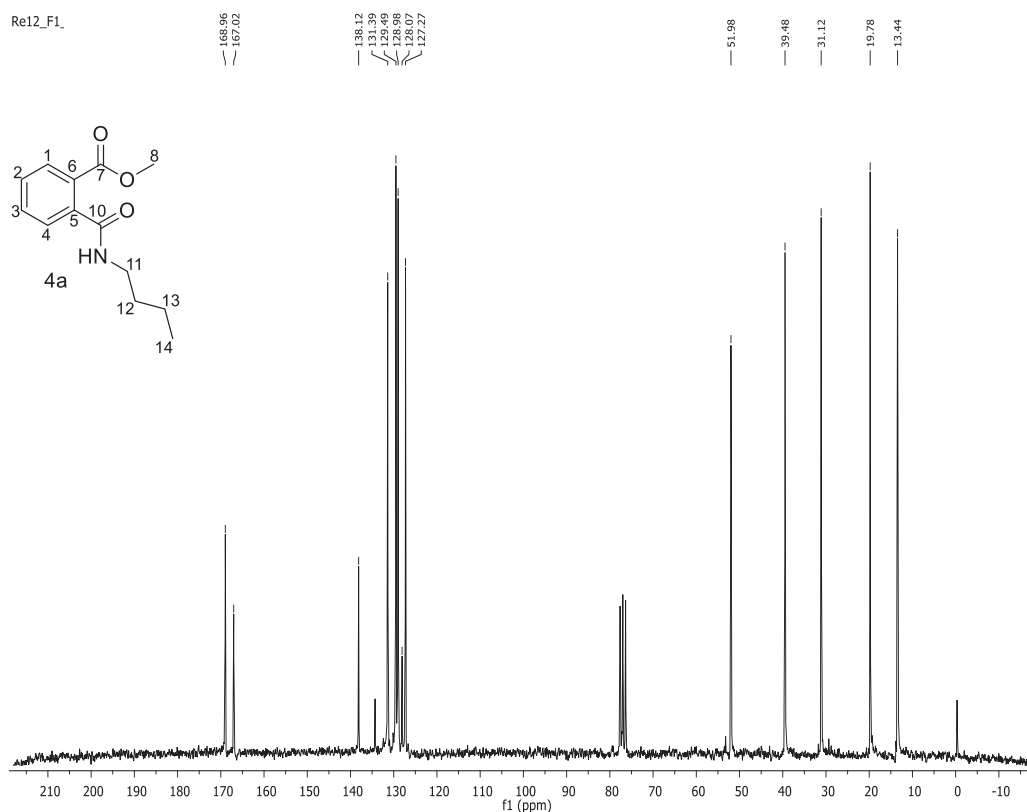
FIGURA 42 - ESPECTRO DE RMN ^1H DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE METILA (4a)

Re12_F1_



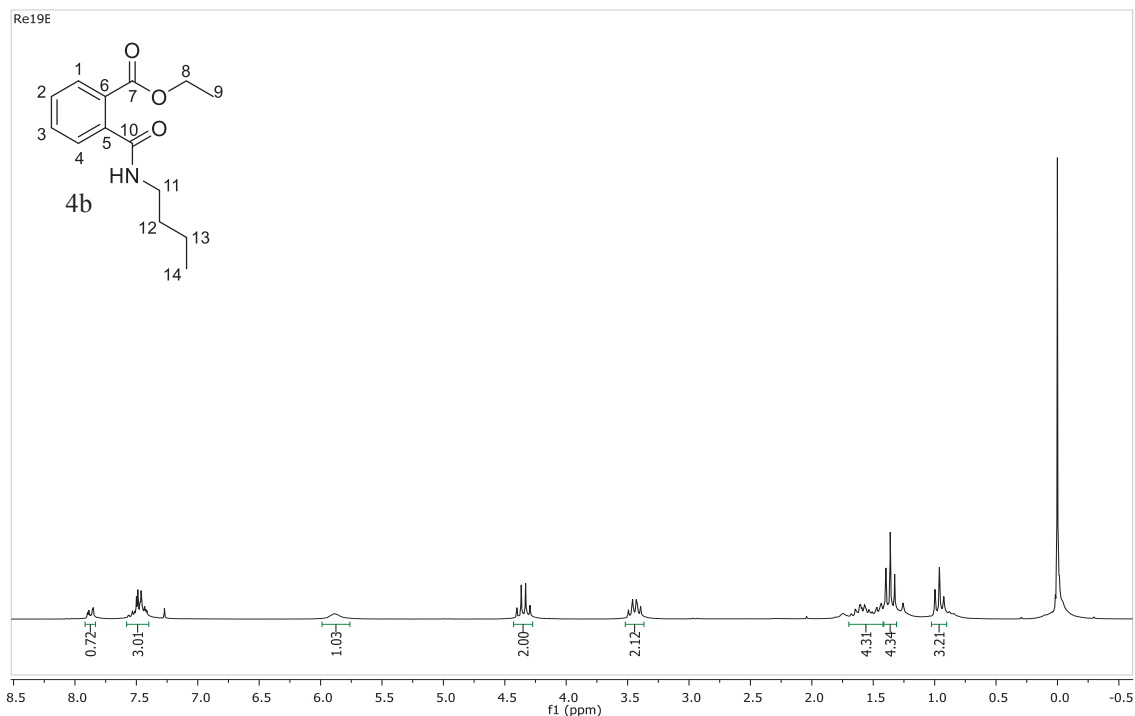
No espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-(butilcarbamoil)-benzoato de metila (4a) (FIGURA 43), observou-se um sinal em 168,96 ppm correspondente à carbonila C-7 do éster e em 167,02 ppm o sinal referente à carbonila C-10 da amida. Os sinais na faixa de 138,12 e 127,27 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. O sinal em 51,98 ppm corresponde ao carbono da metila (C-8) do grupo éster ligado diretamente ao oxigênio e em 39,48 ppm corresponde ao C-11 ligado diretamente ao nitrogênio. Os sinais alifáticos dos C-12 e C-13 aparecem em 31,12 e 19,78 ppm, respectivamente. E o sinal referente ao carbono da metila do grupo amida (C-14), aparece em 14,44 ppm.

FIGURA 43 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE METILA (4a)



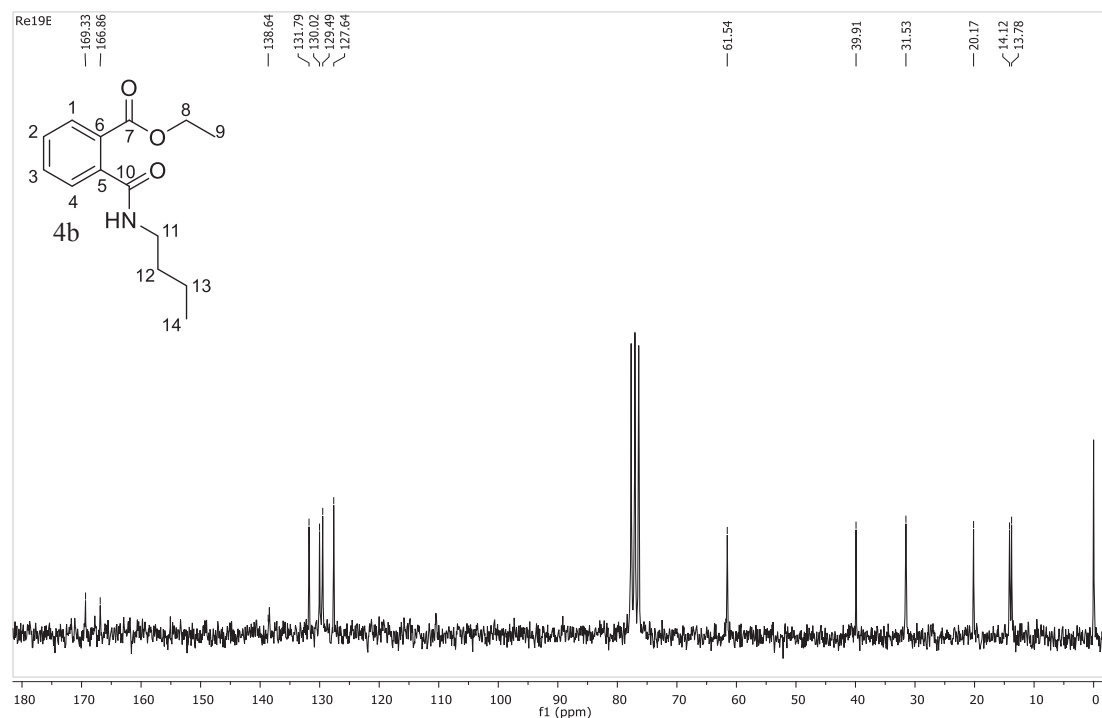
No espectro de RMN de ^1H do composto 2-(butilcarbamoil)-benzoato de etila (**4b**) (FIGURA 44) observou-se um multipeto entre 7,85 e 7,90 ppm referente ao hidrogênio aromático mais desblindado ligado ao C-1 e um multipeto entre 7,41 e 7,56 ppm referente aos outros 4 hidrogênios aromáticos. Em 5,89 ppm observou-se um simpleto largo característico de hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio de amida. Em 4,35 ppm há um quarteto com constante de acoplamento (J) de 7,1 Hz referente aos hidrogênios do C-8 e em 3,44 ppm há um duplo dubleto com constante de acoplamento (J) de 12,9 e 7,1 Hz referente aos desdobramentos dos hidrogênios do C-11. Entre 1,43 e 1,68 ppm é possível observar um multipeto referente aos hidrogênios alifáticos dos C-12 e C-13. Em 1,36 ppm há um tripleto com constante de acoplamento (J) de 7,1 Hz referente aos hidrogênios da metila mais desblindada no C-9 e em 0,96 ppm observou-se outro tripleto com constante de acoplamento (J) de 7,2 Hz referente aos hidrogênios da metila do C-14.

FIGURA 44 - ESPECTRO DE RMN ^1H DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE ETILA (4b)



No espectro de RMN de ^{13}C do composto 2-(butilcarbamoil)-benzoato de etila (4b) (FIGURA 45), observou-se sinais em 169,33 ppm correspondente à carbonila C-7 do éster e em 166,86 ppm o sinal referente à carbonila C-10 da amida. Os sinais na faixa de 127,64 e 138,64 ppm correspondem aos carbonos do anel aromático. O sinal em 61,54 ppm corresponde ao C-8 ligado ao oxigênio e em 39,91 ppm o sinal referente ao C-11 ligado diretamente ao nitrogênio. Os sinais alifáticos dos C-12 e C-13 aparecem em 31,53 e 20,17 ppm, respectivamente. E os sinais referentes às metilas (C-9 e C-14) aparecem em 14,12 e 13,78 ppm.

FIGURA 45 - ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE ETILA (4b)



A seguir serão mostrados os fragmentos de massas dos compostos candidatos a repelentes sendo demonstrados em sua sequência a proposta de fragmentação de massas para o fragmento majoritário.

No espectro de massas do composto 2 - (pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de metila (**3a**) (FIGURA 46), é possível observar dentre os principais fragmentos o íon molecular com razão massa/carga de 233, e os fragmentos com m/z de 163 e 70 formados pelo rompimento da ligação carbonila-N (FIGURA 47).

Em relação aos fragmentos da amida, é observado que quando a amida é formada pela amida de 5 membros (pirrolidina) os fragmentos serão de m/z 70.

FIGURA 46 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3a)

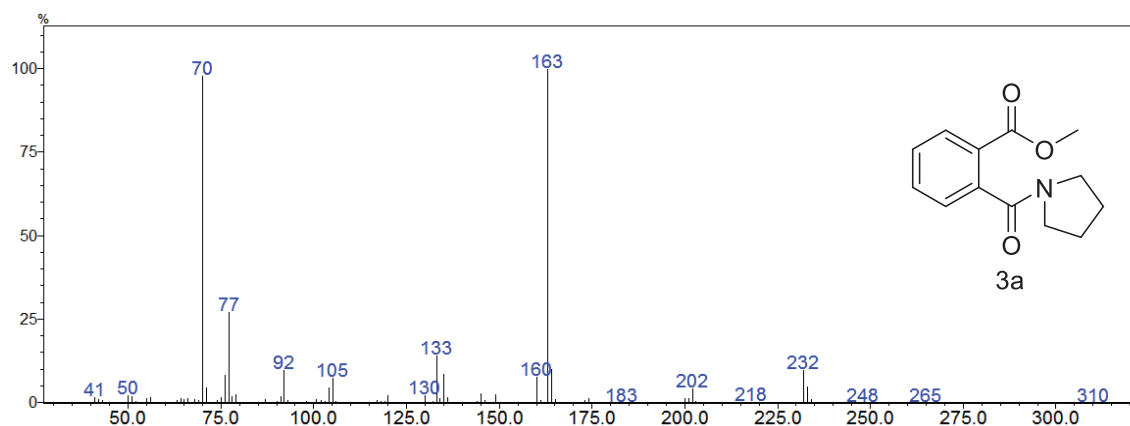
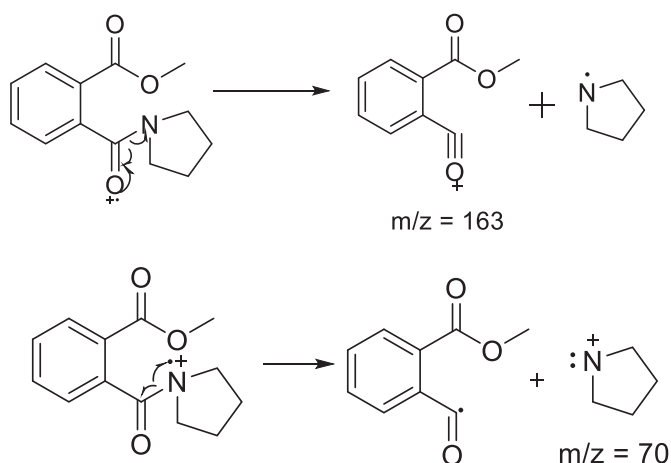


FIGURA 47 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS PARA OS FRAGMENTOS MAJORITÁRIOS, ÍON m/z 163 E m/z 70



No espectro de massas do composto 2-(pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de etila (**3b**) (

FIGURA 48), é possível observar dentre os principais fragmentos o íon molecular com razão massa/carga de 247, com os fragmentos com m/z 149 e 70, fragmento com m/z 149 formado pelo rompimento da ligação carbonila-N, em seguida pelo rearranjo de McLafferty (FIGURA 49) e o fragmento com m/z 70 que se assemelha ao fragmento da figura 47 p. 106.

FIGURA 48 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE ETILA (**3b**)

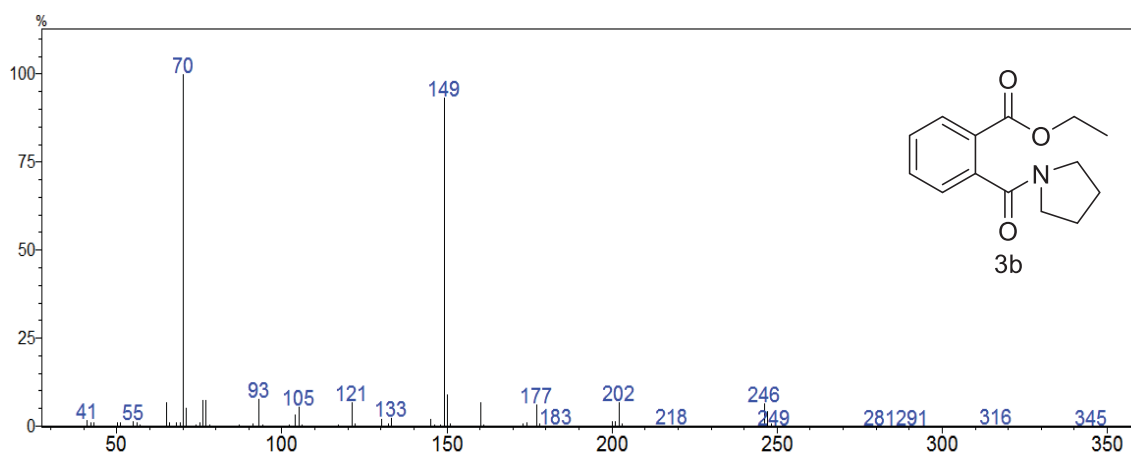
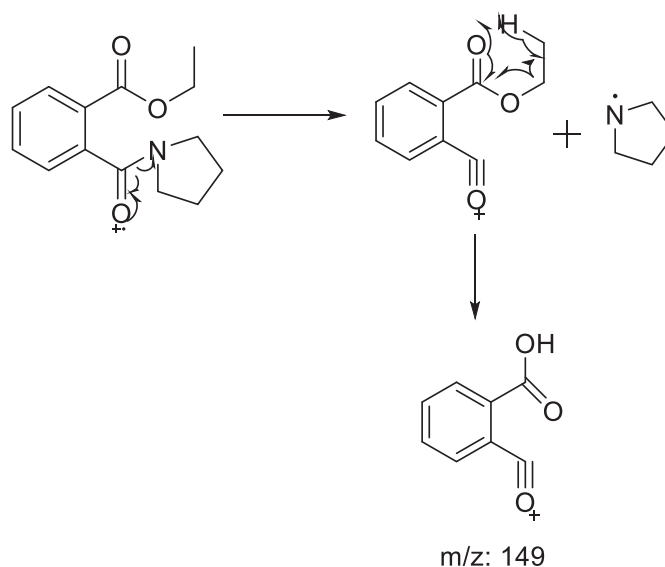
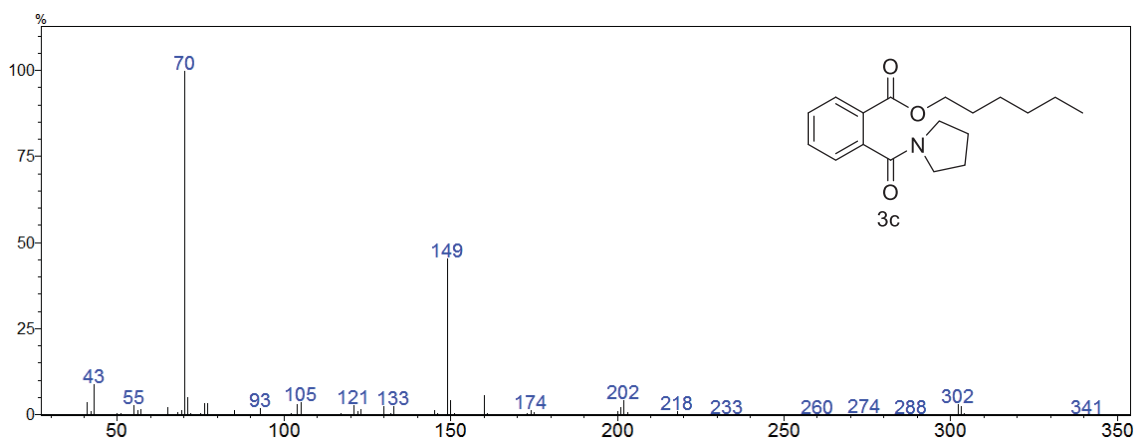


FIGURA 49 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS PARA O FRAGMENTO, ÍON m/z



No espectro de massas do composto 2-(pirrolidil-1-carbonil)-benzoato de hexila (**3c**), é possível observar dentre os principais fragmentos o íon molecular com razão massa/carga de 303, e os fragmentos com m/z 149 e 70.

FIGURA 50 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIRROLIDIL-1-CABONIL)-
BENZOATO DE (3c)



No espectro de massas do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de metila (**3d**) é possível observar dentre os principais fragmentos o íon molecular com razão

massa/carga de 247, e o fragmento com m/z 163 e 84 (FIGURA 52) formados pelo rompimento da ligação carbonila-N.

Em relação aos fragmentos da amida, é observado que quando a amida é formada pela amida de 6 membros (piperidina) os fragmentos serão de m/z 84.

FIGURA 51 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-BENZOATO DE METILA (3d)

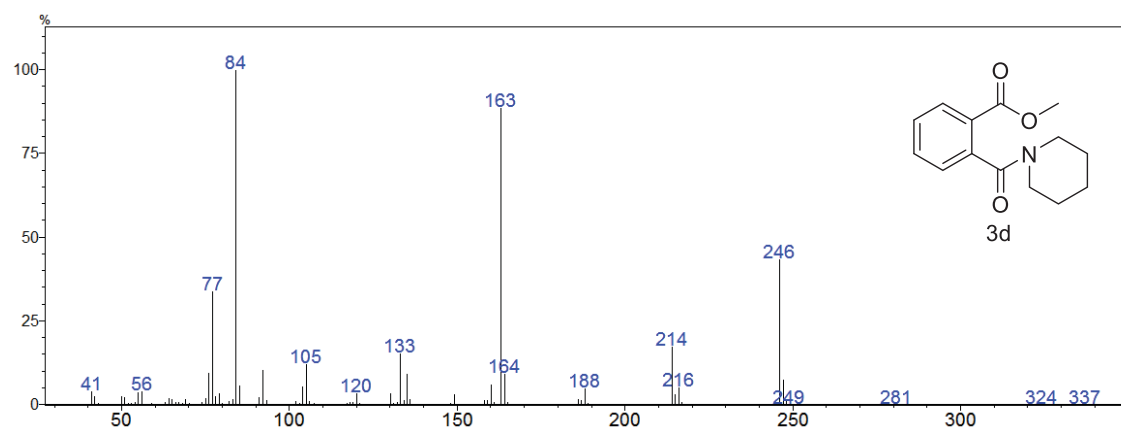
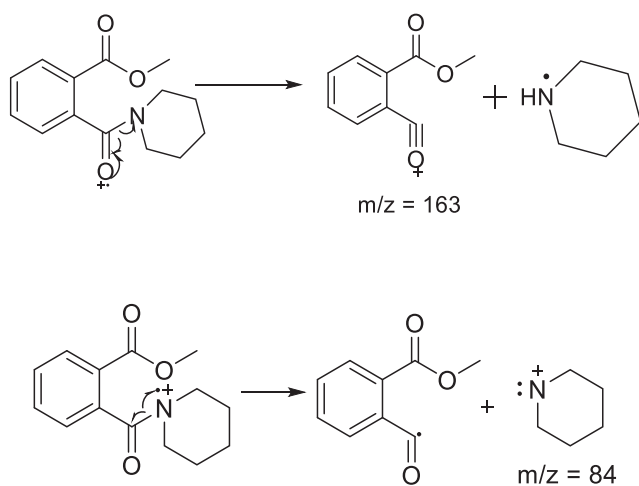
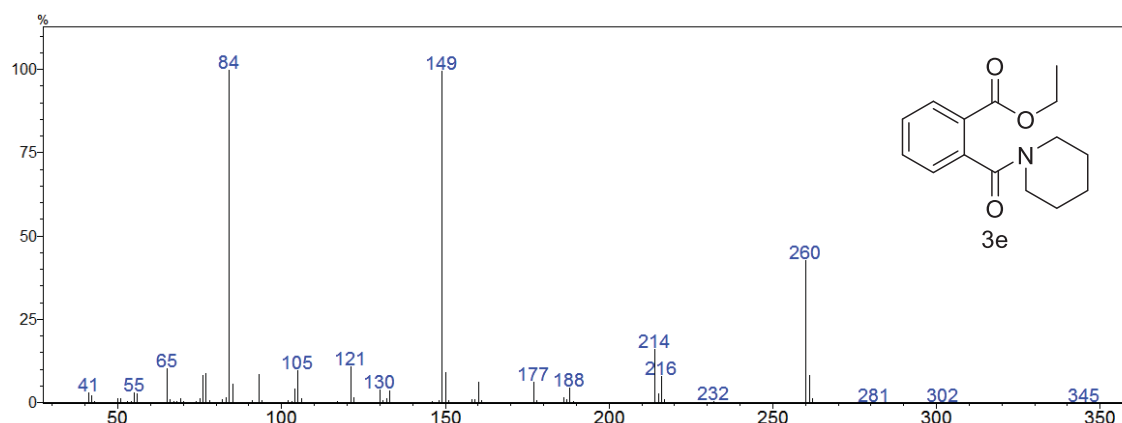


FIGURA 52 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS PARA OS FRAGMENTOS MAJORITÁRIOS, ÍON m/z 163 E m/z 84



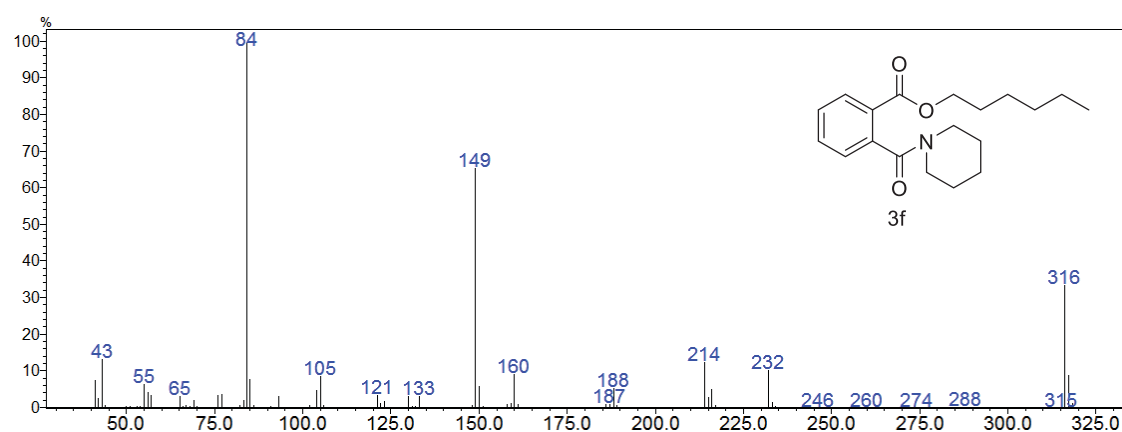
No espectro de massas do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de etila (3e) (FIGURA 53) é possível observar dentre os principais fragmentos o íon molecular com razão massa/carga de 261, e os fragmentos com m/z 149 e 84. Sendo que a proposta dessas fragmentações se assemelha as figuras 49, p.107 e figura 52, p.108 respectivamente.

FIGURA 53 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-
BENZOATO DE ETILA (3e)



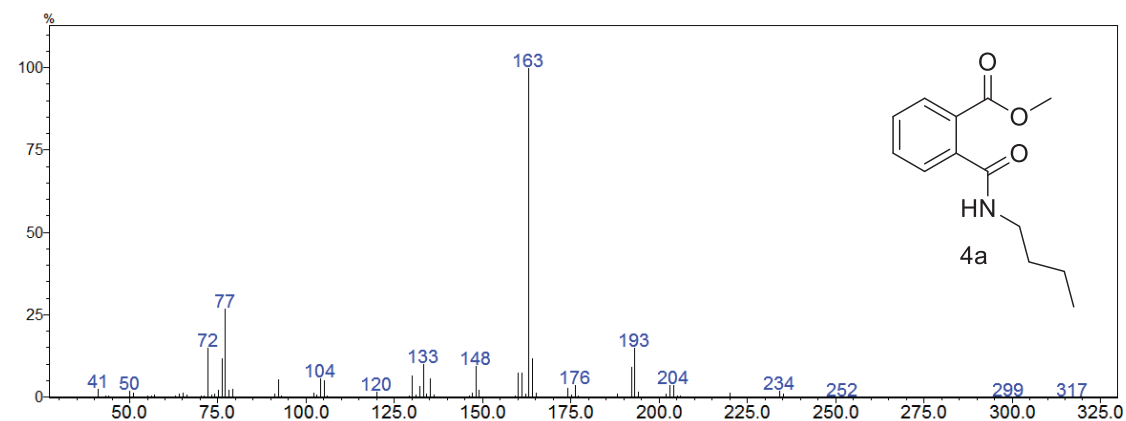
No espectro de massas do composto 2-(piperidinil-1-carbonil)-benzoato de hexila (3f) (FIGURA 54), é possível observar dentre os principais fragmentos o íon molecular com razão massa/carga de 317, e os fragmentos com m/z 149 e 84.

FIGURA 54 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(PIPERIDINIL-1-CARBONIL)-
BENZOATO DE HEXILA (3f)



No espectro de massas do composto 2-(butilcarbamoil)-benzoato de metila (4a) (FIGURA 55), é possível observar dentre os principais fragmentos o íon molecular com razão massa/carga de 235, e o pico base em 163. A proposta de fragmentação desse composto se assemelha a proposta da fragmentação da pg.108.

FIGURA 55 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE METILA (4a)



No espectro de massas do composto 2-(butylcarbamoyl)-benzoato de etila (4b) (

FIGURA 56) é possível observar dentre os principais fragmentos o íon molecular com razão m/z de 249, e os fragmentos com m/z de 177 e 72 formados pelo rompimento da ligação carbonila-N, e o pico base em 149 formado em seguida pelo rearranjo de McLafferty (FIGURA 57).

FIGURA 56 - ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO 2-(BUTILCARBAMOIL)-BENZOATO DE ETILA (4b)

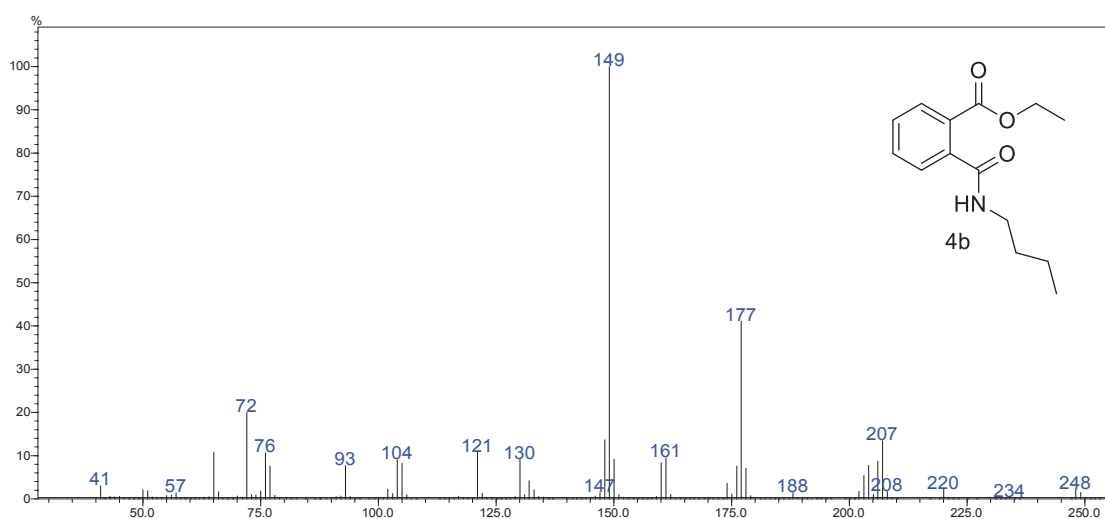
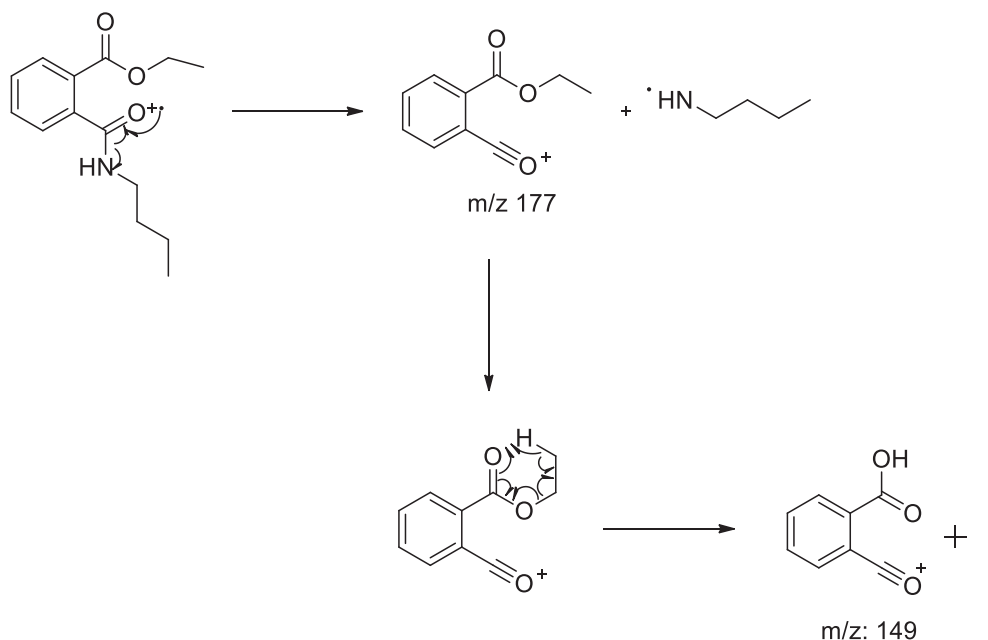


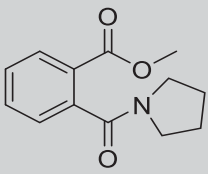
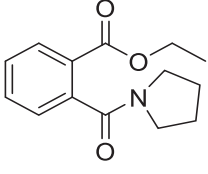
FIGURA 57 - PROPOSTA DE FRAGMENTAÇÃO DE MASSAS PARA OS FRAGMENTOS MAJORITÁRIOS, ÍON m/z 177 E ÍON m/z 149

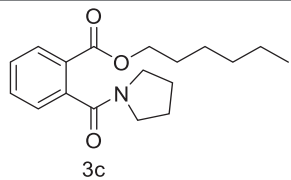
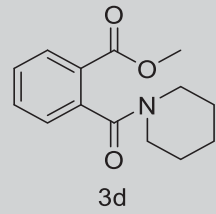
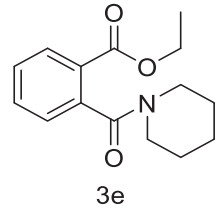
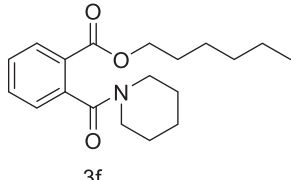
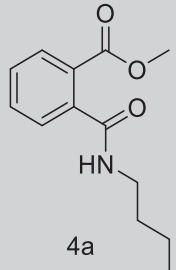
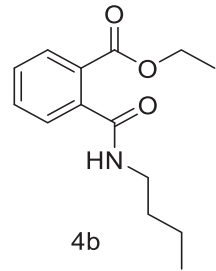


5.12. Teste de repelência dos derivados do anidrido ftálico

Foram usadas soluções etanólicas de 85 $\mu\text{L/mL}$, com 20% do composto ativo, de cada um dos 11 compostos sintetizados. A tabela 25 apresenta o resultado dos testes de repelência realizados. Esses produtos foram aplicados na mão do avaliador para verificar a atividade repelente.

TABELA 25 - TESTE DE REPELÊNCIA DE DERIVADOS DO ANIDRIDO FTÁLICO

Substância	Tempo de repelência
 3a	0
 3b	3 h 15 min
Derivado 3J1	7 h

 3c	2 h e 10 min
 3d	0
 3e	1 h 40 min
Derivado 3J2	6 h
 3f	0
 4a	0
 4b	1 h
Derivado 4J3	2 h 50 min

A modificação das estruturas químicas para melhorar a repelência aos mosquitos requer um entendimento mais profundo da relação estrutura-atividade dos repelentes (WANG et al, 2008). Suryanarayana et al. (1991), correlacionaram a repelência de mosquitos de alguns compostos principalmente com a lipofilicidade (SURYANARAYANA et al, 1991). E isso pode ser observado nas moléculas candidatas

a repelentes, já que com o aumento da porção lipofílica da estrutura, a atividade de repelência da molécula aumentou. Mas isso acontece até atingir um determinado número de carbono no grupo éster e, a partir daí, um aumento na cadeia carbônica leva a um decréscimo na atividade de repelência. Essa observação mostra que além da lipofilicidade das substâncias, um fator relevante também é a pressão de vapor dessas substâncias uma vez que os vapores dessas moléculas têm que atingir os receptores localizados nas antenas dos mosquitos a uma certa taxa para que possa exercer o efeito de repelência

Também grupos substituintes contendo oxigênio e nitrogênio desempenham um papel importante na repelência de mosquitos. Estudos anteriores indicam que repelentes terpenoides com dois grupos funcionais são biologicamente ativos (WANG et al, 2008).

García-Domenech et al. (2009), já haviam discutido com o conjunto de dados do Suryanarayana que o grupo amida possui uma importante contribuição para a atividade repelente de um composto. Em alguns estudos também são discutidos a importância de se ter em uma molécula uma função hidrofóbica aromática (anel aromático) (GARCÍA-DOMENECH et al, 2009; YANARAYANA et al, 1991; KATRITZKY, 2006).

Todas essas informações estão presentes nas estruturas das substâncias sintetizadas e, dessa forma, chegou-se à estrutura do **Derivado 3J1** com alto tempo de repelência de 7 h, comparável às substâncias repelentes comerciais. Atualmente há no mercado apenas 4 substâncias repelentes disponíveis, sendo que o *p*-mentano-3,8-diol apresenta tempo de repelência de aproximadamente 5 h 12 min, já o DEET e o IR3535 tempos de repelência entre 6 e 8 h (ISLAM *et al.*, 2017).

6. CONCLUSÃO

Os estudos envolvendo o desenvolvimento de comprimido e do pó com proteínas do Bti mostraram uma elevada atividade larvicida em todas as formulações testadas, demonstrando que desde o processo de produção das proteínas do Bti até a confecção dos comprimidos e do pó larvicida, o grupo conseguiu alcançar o objetivo proposto. Vale a pena ressaltar que a melhor formulação do comprimido (formulação IV) até agora desenvolvida, demonstrou uma atividade semelhante ao do comprimido WDG, produzido pela Valent Biosciences, o qual é importado pelo governo brasileiro para ser usado em programas de controle populacional do *A. aegypti* em todos os estados brasileiros.

Essas formulações com atividade larvicida, portanto, podem ser uma alternativa nacional para o programa de controle populacional de *A. aegypti* com custos menores e igual eficiência. Os estudos efetuados no Fitotron mostraram que as proteínas do Bti provavelmente não são tão fotolábeis como descrito em literatura e esse trabalho está sendo desenvolvido com o objetivo de demonstrar a não fotolabilidade dessas proteínas, resultado que será descrito pela primeira vez na literatura e que ampliará as possibilidades de utilização dessas proteínas, bem como das produzidas por outras estirpes, para o controle de diferentes pragas.

Ressalta-se que a formulação contendo as proteínas com potencial de serem empregadas para o controle de larvas em grandes superfícies de água, não tem similar no mercado mundial e pode se constituir em importante ferramenta para o controle de mosquitos do gênero *Culex*.

Foi possível também demonstrar pelos testes ecotoxicológicos que os formulados contendo as proteínas de Bti assim como o excipiente utilizado não apresentam nenhuma toxicidade para organismos-testes estudados, logo desta maneira o pó larvicida pode ser inserido no ambiente aquático sem problemas a fauna e flora.

Em relação aos compostos sintetizados com ação repelente tem-se que, dentre os derivados do anidrido ftálico sintetizados, o Derivado 3J1 apresentou um excelente tempo de repelência contra o *A. aegypti*, de 7 h, comparável à repelência de substâncias comerciais. Foi possível realizar um estudo da relação estrutura-atividade dos substituintes presentes na molécula e determinar os melhores substituintes (tanto do grupo éster quando para a expressão da atividade repelente, o que está sendo utilizado em outro trabalho em andamento em nosso laboratório para a síntese de outra substância com

atividade repelente ainda maior, que pode se consolidar como o primeiro repelente de alta eficiência desenvolvido na América Latina.

REFERÊNCIAS

- ABC Cosmetologia: Ativos repelentes de insetos - Química e Derivados. Disponível em: <<http://www.quimica.com.br/abc-ativos-repelentes-de-insetos/>>. Acesso em 24/01/17.
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Pp.1-20. Rio de Janeiro, Projeto NBR 12648:2004. 28ª reunião. 2004.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). São Paulo, 4ª edição, 2016.
- AGÊNCIA BRASIL – Saúde, 2019. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2019-02/oms-alerta-para-possivel-3a-onda-de-surto-de-febre-amarela-no-brasil>. Acesso em 21/08/2019.
- ALMEIDA, P. F.; GIOVANELLA, L. Avaliação em Atenção Básica à Saúde no Brasil: mapeamento e análise das pesquisas realizadas e/ou financiadas pelo Ministério da Saúde entre os anos de 2000 e 2006. **Caderno Saúde Pública**, v. 24, n. 8, p. 1727-42, 2008.
- ALVES, A. C. B.; SILVANO, J.; Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóceras, Crustácea) ao Dicromato de Potássio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n.1, p. 59 - 61. 2006.
- ARAÚJO, A. P.; MELO-SANTOS, M. A. V.; CARLOS, S. O.; RIOS, E. M. M. M.; Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). **Biological Control**, v. 41, p. 339–347, 2007.
- ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA – AMB, Sociedade Brasileira de Infectologia. Disponível em: [http://https://www.infectologia.org.br/admin/zcloud/125/2017/01/Informativo_Febre_Amarela_Profissionais_de_saude.pdf](https://www.infectologia.org.br/admin/zcloud/125/2017/01/Informativo_Febre_Amarela_Profissionais_de_saude.pdf). Acesso em 15/10/19
- ANDRADE, C. F. S.; Repelentes de Mosquitos–Base Técnica para Avaliação. **Artigos Técnicos - UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Zoologia**, Campinas, 9pp. 2008.
- ARAUJO-COUTINHO, C. J. P. C.; Biological control program against simuliids in the State of São Paulo, Brasil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 1, p. 131-133, 1995.

- ARCHARYA, K; SCHULMAN, C; YOUNG, M. H.; Physiological response of *Daphnia magna* to linear anionic poltacrlyamide: Ecological implications for receiving waters. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 212, n. 4, p. 309-317, 2010.
- AUGUSTO, L. G. S.; CARNEIRO, R. M.; MARTINS, P. H.; Abordagem ecossistêmica em saúde: ensaios para o controle do dengue. **Caderno Saúde Pública**, v. 23 n.3, p. 734 – 736, 2007.
- BECKER N.; Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles JF, Delécluse A, LeRoux CN. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**; v. 90, n. 1. p. 383-98, 2000.
- BELTRÃO, H. B. M.; Interação das toxinas Cry do *Bacillus thuringiensis* var. israelensis com o mesêntero de larvas do vetor *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz**, Recife, 2006.
- BLANDIN, S. A.; MAROIS, E.; LEVASHINA, E. A.; Antimalarial responses in *Anopheles gambiae*: From a complement-like protein to a complement-like pathway. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 1, p. 364-374, 2008.
- BRADFORD, M. M.; **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 3, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D.; *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 179-293, 2007.
- BRAVO, A.; SOBERON, M.; How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**. v. 26, n. 10, p. 573-579, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Monitoramento da resistência das populações de *Aedes aegypti* do país. Brasília, 2000.
- CALDAS, L. Q. A.; Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos bipiridílicos e piretroides. Rio de Janeiro. **Centro de controle de intoxicações**, v. 1, p. 12, 2000.
- CARVALHO, R. G; OLIVEIRA, R. L; BRAGA, I. A.; Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 787-96, 2014.
- CASTRO, J. S. M; ROZEMBERG, B.; Propaganda de inseticidas: estratégias para minimização e ocultamento dos riscos no ambiente doméstico. **Saúde e Sociedade**, v. 24, n. 1, p. 308–320, 2015.
- CIRCUNVIS, B. C.; Organoclorados e organofosforados: principais características e seus efeitos potencias à saúde humana. **Revista uningá review**, v. 3, n. 1, p. 4, 2017.

- COLOMBO, P.; Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 3, n. 6, p. 198-204, 2000.
- COSTA, A. E. A; FERREIRA, L. G. Considerações sobre o dengue clássico e o hemorrágico. **Pharmacia Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 49-54, 2002.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- CHAPMAN, P. M.; Emerging substances — Emerging problems? **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.25, n.6, p.1445-1447. 2006.
- CHRISTOPHERS, S. R.; *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. **Thesis - The syndics of the Cambridge University press**, 1960.
- CHUI, V. W. D.; WONG, K. W.; TSOI, K. W.; Control of mosquito larvae (Diptera: Culicidae) using Bti and teflubenzuron: laboratory evaluation and semi-field test. **Environment international**, v. 21, n. 4, p. 433-440, 1995.
- CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J.; Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquito cidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. v. 101, n. 7, p. 249-254, 1995.
- DAMATO, M.; Estudo da influência do nível de tratamento de efluentes de refinarias de petróleo na sua toxicidade, empregando diferentes espécies indicadoras. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1997.
- FEELY, L. S.; DAVIS, S. S.; The influence of surfactants on drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 41, n. 1-2, p. 83-90, 1988.
- FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L.; *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Nature Biotechnology**, v. 10, p. 271-275, 1992.
- FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas: comprimidos e comprimidos revertidos. 2016. Disponível em: <http://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=1808509>. Acesso 14.01.19
- FIGUEIREDO, L. T. M.; Vacinas contra o dengue. **Medicina**, v. 32, n. 2 p. 21-25, 1999.
- FORATTINI, O. P.; Entomologia médica. **Mosquito Taxonomic Inventory**, v. 1, 1962.

- FLORIS, R.; BODNÁR, I.; WEINBRECK, F.; ALTING, A. C.; Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. **International Dairy Journal**, v.18, n. 5, p. 566–573, 2008.
- FRADIN, M. S.; Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. **Annals of internal medicine**, v. 128, n. 11, p. 931-940, 1998.
- FRADIN, M. S.; DAY, J. F.; Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 1, p. 13-18, 2002.
- GAINES T. B.; Acute toxicity of pesticides. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 14, n. 3, p. 15-534, 1969.
- GALZER, E. C. W.; FILHO, W. S. A.; Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplina de Ciência Aplicada**. v.1, n. 1, 2016.
- GARCÍA-DOMENECH, R., AGUILERA, J., MONCEF, A. E., POCOVÍ, S., & GÁLVEZ, J.; Application of molecular topology to the prediction of mosquito repellents of a group of terpenoid compounds. **Molecular Diversity**, v. 1, n. 2, p. 321–329. 2009.
- GEORGHIOU, G.P.; WIRTH, M.C.; Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 3, p. 1095-1101, 1997.
- GHERARDI-GOLDSTEIN, E., BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P. A., ARAUJO, R. P. A. & RAMOS, M. L. L. C.; Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. **CETESB**, São Paulo, Série manuais, v. 6, n. 2, p. 17, 1990.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M. M.; Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, n. 5, p. 751-66, 1949.
- GUZMAN, M. G; HALSTEAD, S. B; ARTSOB, H; BUCHY, P.; et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. S7 – 16, 2010.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H.; Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review Entomology**, v. 45, p. 371-391, 2000.
- HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 3 ed, p. 268, 2001.
- HONMA, T.; HAYASHI, K.; et al. Structure-based generation of a new class of potent cdk4 inhibitors: new de novo design strategy and library design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 4615-4627, 2001.

- ISLAM, J.; ZAMAN, K.; DUARAH, S.; RAJU, P. S.; CHATTOPADHYAY, P.; Mosquito repellents: an insight into the chronological perspectives and novel discoveries. **Acta Tropical**, v. 167, p. 216-230, 2017.
- KAIN, P.; Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. **Nature**, v. 502, p. 507-512, 2013.
- KATRITZKY, A. R.; DOBCHEV, D. A et al.; QSAR study of mosquito repellents using Codessa Pro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2306–2311. 2006.
- KNIE, J.L.W.; LOPES E.W.B. Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. – **Florianópolis: FATMA/GTZ**. p. 289, 2004
- KOREN, G; MATSUI, D; BAILEY, B. DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. **Medical Association Journal**, v. 169, n, 3, p. 209-212, 2003.
- LANGER, K.; BALTHASAR, S.; VOGEL, V.; DINAUER, N.; VON BRIESEN, SCHUBERT, H.D.; Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **International Journal of Pharmacy**, v. 257, n, 2, p. 169–180, 2003.
- LECADET, M. M; MARTOURET, D.; Enzymatic hydrolysis of the crystals of *Bacillus thuringiensis* by the proteases of *Pieris brassicae* II. Toxicity of the different fractions of the hydrolysate for larvae of *Pieris brassicae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, n. 3, p. 322-330, 1967.
- LONDRES, F.; Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. **AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**, v. 1, 2011.
- LOPES, C. M; LOBO, J. M. S; COSTA, P.; Modified release of drug delivery systems: hydrophilic polymers. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, vol. 41, n.2, p.143-154, 2005.
- MARCONDES, C. B.; Entomologia médica e veterinária. **Revista Instituto de Medicina tropical**, v. 53, n. 3, p. 59-103, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde), CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças), 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias

de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Febre de chikungunya: manejo clínico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Chikungunya: manejo clínico. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Febre amarela: guia para profissionais de saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 5 de 2018, v. 49, n. 7, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico, Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA), v. 50, n.7, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico | Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde. v. 50. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico | Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde. v. 49. 2018.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. **Controle biológico**, v. 3, p.163-200, 2000.

NAVON, A.; *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection-reality and prospects. **Crop Protection**, v. 19, n. 9, p. 669-676, 2000.

NATAL, D.; **Biológico**, v. 64, p. 205-207, 2002.

NELSON M.J.; *Aedes aegypti*: biología y ecología. **Organización Panamericana de la Salud**; 1986.

NIETO, R. Caracterização ecotoxicológica de efluentes líquidos industriais – ferramenta para ações de controle da poluição das águas. **Anais 17º Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**. 2000.

NUNES, M. R; FARIA, N. R; VASCONCELOS, J. M; GOLDING, N, KRAEMER, M. U; OLIVEIRA, L. F; et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 102, p. 1-10, 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2018. Disponível em: OPAS/OMS Brasil - Folha informativa – Malária. Acesso em: 21.02.19.

PAIVA, K. B. S.; MENEZES, M. L.; Avaliação do emprego dos adsorventes: carvão ativo, chomisorb w e membrana C18 na preparação de amostras de ar para a determinação de D-alettrina em ambientes fechados. **Eclética Química**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 97-103, 2003.

PALCHICK, S.; Chemical control of vectors. In Beaty JB & Marquardt WC (eds), *Biol Dis Vectors*, University Press Colorado, Colorado, v. 23, p. 502-511, 1996.

PANZA, M.; Agro Pesquisas. Tudo sobre inseticidas. Disponível em: <<http://http://agropesquisas.blogspot.com/2015/04/tudo-sobre-inseticidas.html>>. Acesso em: 20.11.18

PERES, F., MOREIRA, J. C.; É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente **Fiocruz**, v, 20, n. 2, p. 384, 2003.

PERIN, G.; Ecotoxicologia: Integrada Quantitativa. **UNIVILLE**. V. 1, p. 356, 2005.

PISUTTHANAN, S.; PLIANBANGCHANG, P.; PISUTTHANAN, N.; RUANRUAY, S.; MUANRIT, O.; Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. **Naresuan University Journal**, v.12, p. 13-18, 2004.

PORT, Â.; Promoção de saúde para a proteção da ação do vetor *aedes aegypti*: um relato de vivência. **Salão do Conhecimento**, v. 2, n. 1, 2016.

PRISTA, L. N.; **Tecnologia Farmacêutica**. 5. ed. 1995.

RAO, K. V; DEVI, K. P.; Swelling controlled-release systems: recent developments and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 48, n. 2, p. 1-13, 1988.

REGINATTO, V.; Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais. Universidade Estadual de Campinas – Instituto de química. Tese doutorado. 1998.

RIBEIRO JUNIOR, K. A. L.; Produtos utilizados no controle do mosquito *Aedes Aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae). Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Universidade Federal de Alagoas, 2007.

- ŠEBESTA, K.; HORSKA, K.; Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis**, v. 209, n. 2, p. 357-367, 1970.
- SIQUEIRA, J.M, BOMM, M.D, PEREIRA, N.F.G, GARCEZ, W.S, BOAVENTURA MAD.; Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Revista Química Nova**. v. 21, n. 5, p 577-579, 1998.
- SIEPMANN, J; PEPPAS, N.A.; Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 163-174, 2012.
- SILVA, C.; Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 39, v. 2, p. 1-20, 2003.
- SOARES, L. A. L.; PETROVICK, P. R.; Física da compressão. **Caderno de Farmácia**, v. 15, p. 65-79, 1999.
- SOUTO, F. J. B.; Influências de parâmetros ambientais sobre *Artemia* sp (Branchiopoda: Artemiidae) em uma salina artesanal do estado do Rio Grande do Norte. Curso de Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia, Universidade Federal da Paraíba, 1991.
- SURYANARAYANA, M. V. S.; PANDEY, K. S. et al. Structure-Activity Relationship Studies with Mosquito Repellent Amides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n, 11. P. 1055–1057, 1991.
- STEFANI, G. P; PASTORINO, A. C.; CASTRO, A. P. B. M; FOMIN, A. B. F., JACOB, C. M. A. Insect repellents: recommendations for use in children. **Review Paulista Pediatrics**, v. 27, n. 1, p. 81-89, 2009.
- VILARINHOS, P. T. R; DIAS, J. M. C. S; ANDRADE, C. F. S; ARAUJO-COUTINHO, C. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. **Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz**; v. 36, n. 6, p. 447-80, 1998.
- VILARINHOS, P. T. R; MONNERAT, R.; Larvicidal persistence of formulations of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* to control larval *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 20, p. 311-314, 2004.
- TAFURI, J.; ROBERTS, J.; Organophosphate poisoning. **Annals Emergency Medicine**, v. 16, n. 2, p. 193-202, 1987.

- WAKABAYASHI, K.; UCHIDA, T.; YAMAZAKI, S.; KIMURA, K. Preparation of poly(4-phthalimide) nanoribbon by reaction-induced crystallization. **Macromolecules**, v. 41, n. 4, p. 4607-4614, 2008.
- WAN, L. S. C; HENG, P. W. S; WONG, L. F.; The effect of hydroxypropyl methylcellulose on water penetration into a matrix system. **International Journal Pharmaceutics**, v. 73, n. 3, p. 111-116, 1991.
- WANG, Z.; SONG, J et al.; QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six-member-ring. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2854–2859. 2008
- WHO - World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, 2005.
- WHO. Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. 2009.
- WHO. Pesticide Evaluation Scheme, 2014.
- WHO. Global technical strategy for malária 2016-2030. World Health Organization. 2015.
- WHO. Global vector control response 2017-2030. World Health Organization. 2017.
- ZENKEVICH, I. G.; FAKHRETDINOVA, L. N.; Chromatografic and chromatosspectral chraracteristic of dicarboxylic acid monoesters. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 1204-1214, 2016.